



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

KAYMERÊ BISPO ROSSI

PARTICIPAÇÃO DA APOLIPOPROTEÍNA-E NA
ATIVIDADE MICROBICIDA “*in vitro*” CONTRA O
Mycobacterium tuberculosis

Vitória
2014

KAYMERÊ BISPO ROSSI

**PARTICIPAÇÃO DA APOLIPOPROTEÍNA-E NA
ATIVIDADE MICROBICIDA “*in vitro*” CONTRA O
*Mycobacterium tuberculosis***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Doenças Infecciosas.

Orientador: Prof. Rodrigo Ribeiro Rodrigues

Vitória

2014

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

R831p Rossi, Kaymerê Bispo, 1990-
Participação da apolipoproteína-E na atividade microbicida
“in vitro” contra o Mycobacterium tuberculosis / Kaymerê Bispo
Rossi. – 2014.
71 f. : il.

Orientador: Rodrigo Ribeiro Rodrigues.

Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) –
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da
Saúde.

1. Tuberculose. 2. Apolipoproteína E. 3. Mycobacterium
tuberculosis. I. Rodrigues, Rodrigo Ribeiro. II. Universidade
Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde.
III. Título.

CDU: 61



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

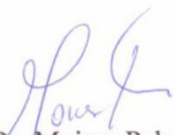
PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO


A mestrand KAYMERÊ BISPO ROSSI apresentou a dissertação intitulada “**Participação da Apolipoproteína-E na Atividade Microbida *In Vitro* contra o Mycobacterium tuberculosis**” em sessão pública, como requisito final para obtenção do título de Mestra em Doenças Infecciosas, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

Considerando a apresentação oral dos resultados, a qualidade e relevância dos mesmos, a Comissão Examinadora decidiu (x) **aprovar** () **reprovar** a dissertação para habilitar a farmacêutica KAYMERÊ BISPO ROSSI a obter o Grau de MESTRA EM DOENÇAS INFECCIOSAS.

Vitória, ES, 29 de agosto de 2014


Prof. Dr. Marco César Cunegundes Guimarães
(Membro externo)


Prof. Dr. Moises Palaci
(Membro interno)


Prof. Dr. Rodrigo Ribeiro Rodrigues
(Orientador)

Dedico esta dissertação a Darcy Rossi e Maria de Fátima Bispo Rossi, meus heróis que, muitas vezes abdicaram dos seus sonhos para realizarem os meus.

Obrigada por tudo!

AGRADECIMENTOS

Agradeço

Aos meus pais, Darcy e Fátima. Agradeço ao meu pai, que não está mais entre nós, mas deixou como herança seus ensinamentos e sua pureza de alma. À minha mãe, pelo amor, compreensão e o exemplo de determinação que sempre foi.

Aos meus irmãos, Miniarê e Ycaro, pela paciência e por estarem sempre ao meu lado, mesmo nos momentos mais difíceis.

Ao Lucas pela paciência de me escutar, mesmo quando não entendia uma palavra do que eu estava falando e me incentivar, a cada vez em que eu pensei em desistir.

Ao meu orientador Professor Rodrigo Ribeiro Rodrigues, pela oportunidade e seus valiosos ensinamentos, bem como pela confiança, incentivo e compreensão durante esses anos.

Ao Professor Daniel Cláudio de Oliveira Gomes, por todo apoio dedicado à mim e suas palavras norteadoras no decorrer deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia: Bruna, Carlinha, Caio, Carlos, Carol, Emmanoel, Estevão, Flavinha, Glênia, Janete, Janine, Lolo, Lu, Marcelle, Naira, Naty, Priscila, Raquel e Vavá, pela sincera amizade e companheirismo, fundamentais no dia a dia da pesquisa.

Em especial, à Flavinha, Lolo e Pri, por terem sido meu braço direito, pela imensa ajuda e divertida companhia nas mais longas incubações e experimentos;

À Glênia e Marcelle, pelo apoio técnico e moral, e os ensinamentos sobre algo desconhecido para mim;

À Lu, pela ajuda com a correção desta dissertação e valiosos conselhos.

Aos amigos do Laboratório de TB: Dete, João, Ledüç, Renata e Luiz Guilherme. Obrigado por me ajudarem sempre que necessitei.

Aos amigos Laura, Pedro, Paola, Lu Bueno, Adriano, Fernandinha e Tiago, pela companhia nos momentos alegres, mas principalmente nos momentos de

aflição. Em especial aos dois últimos, pelo suporte que têm me dado, principalmente nessas últimas semanas.

Aos amigos de infância Gustavo e Fernanda, pelos momentos de descontração, força e pelo carinho.

Aos colegas do NDI pelas palavras amigas e momentos de descontração.

À Lau, que trabalhou com muito carinho para que todos os materiais necessários para os experimentos estivessem sempre limpos e impecáveis.

À banca examinadora, pelas suas excelentes contribuições e novas idéias. Obrigada Professor Marco Cesar Cunegundes Guimarães e Professor Moisés Palaci.

Ao Programa de Pós Graduação em Doenças Infecciosas, em especial às secretárias, pela amizade e auxílio nas questões burocráticas.

A cada uma das pessoas que doou seu sangue para execução dos experimentos. Sem vocês, este estudo não seria possível.

Ao CNPq, pela bolsa concedida durante o mestrado.

*"We are a formidable mixture of nucleic acids and memory,
of desire and proteins."*

François Jacob

Participação da Apolipoproteína-E na atividade microbicida “*in vitro*” contra o *Mycobacterium tuberculosis*

RESUMO

A parede celular de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) é constituída por 60% de lipídios, impedindo a passagem de uma grande quantidade de substâncias, além de desempenhar um importante papel na imunopatogênese. A apresentação desses antígenos aos linfócitos se dá por meio de moléculas do tipo CD1. Por sua vez a Apolipoproteína-E (ApoE), glicoproteína amplamente distribuída nos tecidos, pode facilitar a apresentação de lipídios pelo CD1. A ApoE possui três principais alelos ApoE- ϵ 2, 3 e 4, que codificam três isoformas de proteínas, tipos 2, 3 e 4, que possuem diferentes estruturas e funções. A presença de determinadas isoformas da ApoE está associada a doenças infecciosas, como herpes labial, dano hepático severo causado pelo vírus da hepatite C, diarreia infantil e tuberculose pulmonar. Neste contexto, avaliamos a participação da ApoE na atividade microbicida *in vitro* frente ao Mtb. Para tanto, foram arrolados 13 indivíduos PPD-, 17 indivíduos PPD+ e 4 indivíduos com tuberculose pulmonar ativa. O uso de plasma humano depletado de ApoE nos experimentos de atividade microbicida *in vitro* mostraram um aumento significativo ($p=0,02$) no número de micobactérias (431.5 ± 81.92 UFC) quando comparado ao grupo controle (313.0 ± 74.61 UFC). Esses resultados foram confirmados por um modelo experimental utilizando esplenócitos de camundongos de camundongos C57BL/6 (815.9 ± 76.32 UFC) e animais APOE nocaute (1133 ± 86.85 UFC) ($p = 0.021$). Quanto à produção de IL-10, no grupo PPD+, observamos que o grupo com depleção de ApoE (866.7 ± 447.8) apresentou uma produção menor desta citocina com relação ao controle infectado (1089 ± 481.3) ($p=0,023$). Já em relação ao IFN- γ , em ambos os grupos observou-se, após 72 horas, uma tendência à diminuição da produção dessa citocina no grupo com depleção, com relação ao grupo controle. Esses dados sugerem que a ApoE tem papel distinto na ativação da resposta imune e sua ausência pode prejudicar a resposta imune frente à tuberculose.

Palavras chave: Tuberculose, apolipoproteína E, ApoE, *Mycobacterium tuberculosis*, Purified Protein Derivative, PPD

Apolipoprotein-E participation at microbicidal activity against *Mycobacterium tuberculosis*

ABSTRACT

Lipids compose about 60% of the *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) cell wall, preventing the passage of a large amount of substances and plays an important role in its immunopathogenesis. CD1 molecules present these antigens to lymphocytes. Apolipoprotein E (ApoE) is a glycoprotein with wide tissue distribution, which facilitates the presentation of lipids by CD1. ApoE has three major protein isoforms: ApoE2, ApoE3 and ApoE4, which have different structure and function. Some isoforms are associated to some infectious diseases, such as labial herpes, severe liver damage caused by hepatitis C, children diarrhea and lung tuberculosis. At this context, we evaluated the involvement of ApoE in microbicidal activity in vitro against Mtb. Hence, 34 volunteers were invited to participate in our study, 13 TST-, 17 TST+ and 4 individuals with active pulmonary tuberculosis. The use of ApoE depleted human plasma at the *in vitro* microbicidal activity assays showed a significant increase ($p=0,02$) in the numbers of mycobacteria (431.5 ± 81.92 UFC) when compared to the control group (313.0 ± 74.61 UFC). Those results were confirmed by an experimental model using splenocytes from C57BL/6 mice (815.9 ± 76.32 UFC) and APOE knockout animals (1133 ± 86.85 UFC) ($p = 0.021$). In addition, cells from TST positive individuals produced significantly lower IL-10 when infected by Mtb in the presence of ApoE depleted human plasma (866.7 ± 447.8 pg/ml) than in the presence of untreated plasma (1089 ± 481.3) ($p=0,023$). Our data suggest that ApoE have a remarkable role in the activation of immune response and its absence can impair immunity to tuberculosis.

Keywords: Tuberculosis, apolipoprotein E, ApoE, *Mycobacterium tuberculosis*, Purified Protein Derivative, PPD

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Vias exógenas para apresentação de antígenos lipídicos mediadas pela Apolipoproteína E. Fonte: VAN DEN ELZEN et al., 2005.	21
Figura 2: Esquema da metodologia utilizada para os ensaios da interferência da ApoE na atividade microbica <i>in vitro</i>	31
Figura 3: Gel de poliacrilamida do RFLP. Colunas de 1 a 8: Amostras de pacientes; Coluna 9: Padrão APOE ε3ε3; Coluna 10: Padrão APOE ε2ε4; Coluna 11: Padrão APOE ε3ε4.	42
Figura 4: Análise quantitativa do número de unidades formadoras de colônias (UFC) a partir de ensaios WBKA em amostras de sangue total de indivíduos PPD- (n=12) e PPD+(n=12). Resultados de cada um dos grupos refletem as UFCs encontradas, após 4 e 72hs de incubação.	43
Figura 5: Atividade microbica em culturas de sangue total de indivíduos portadores de diferentes genótipos, incubadas por 4 e 72 horas com a cepa H37Rv. Os resultados estão expressos em média da concentração bacilar (UFC/ml) e desvio padrão para cada grupo analisado.	43
Figura 6: Atividade microbica em culturas de CMSP na presença de plasma depletado de ApoE ou não depletado utilizando coluna de imunoafinidade, incubadas por 4 e 72h com H37Rv.	44
Figura 7: Atividade microbica <i>in vitro</i> de esplenócitos de camundongos C57BL/6 e APOE-/-, incubados por 4 e 72h com H37Rv.	45
Figura 8: Perfil das medianas dos valores de UFC obtidos por cada grupo, após incubação por 4 e 72h com H37Rv. Em A, observamos os resultados do experimento com células humanas, na presença de plasma com ApoE ou depletado. Em B, observamos os resultados do experimento utilizando células murinas, nocaute ou não para APOE.	45
Figura 9: Nível de Interferon gama em sobrenadante de culturas de CMSP de indivíduos PPD+ e PPD- infectadas com a cepa H37Rv após 4 e 72h de infecção, na presença de plasma depletado ou não. Os resultados estão expressos em média de concentração da citocina (pg/ml) e desvio padrão para cada grupo analisado.	46

Figura 10: Interleucina 10 em sobrenadante de culturas de CMSP de indivíduos PPD+ e PPD- infectadas com a cepa H37Rv após 4 e 72h de infecção, na presença de plasma depletado ou não de ApoE. Os resultados estão expressos em média de concentração da citocina (pg/ml) e desvio padrão para cada grupo analisado47

Figura 11: Nível de ApoE em sobrenadante de cultura de CMSP infectadas com Mtb, na presença de plasma tratado ou não por coluna de imunoafinidade, após 4 e 72h de incubação. Os resultados estão expressos em média de concentração (ng/ml) e desvio padrão para cada grupo analisado.48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados demográficos dos indivíduos arrolados neste estudo.....	41
Tabela 2: Frequência relativa dos alelos, dividida por grupos.....	42

LISTA DE SIGLAS

AIDS – Síndrome da imunodeficiência adquirida
APC – Células apresentadoras de antígenos
ApoE - Apolipoproteína E
APOE – Gene da Apolipoproteína E
Arg – Arginina
BAAR – Bacilo Álcool-Ácido Resistente
BSA – *Bovine serum albumin*
CCI – Controle de crescimento do inóculo
CEP-ES – Conselho de Ética em Pesquisa do Espírito Santo
CD – *Cluster of differentiation*
 $C_3H_5(OH)_3$ – Glicerol
CMSP – Células mononucleares sangue periférico
CNBr – Brometo de cianogênio
 CO_2 – Dióxido de carbono
Ctrl – Controle
Cys – Cisteína
C57BL/6 – Camundongo da linhagem C57 *black 6*
DCs – *Dendritic cells*
DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle's medium*
DNA – Ácido desoxiribonucleico
DO – Densidade ótica
ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*
GATA-3 – *Trans-acting T-cell-specific transcription factor GATA-3*
HCl – Ácido clorídrico
HCV – Vírus da hepatite C
HIV – *Human immunodeficiency virus*
HRP – *Horseradish peroxidase*
HSPG – Proteoglicanos formados por sulfato de heparana
 H_3PO_4 – Ácido fosfórico
H37Rv – Cepa ATCC 27294
IFN – *Interferon*
IL – Interleucina
KDa – Quilo Dalton

LDL – *Low density lipoproteins*
LTBI – Infecção latente pelo *Mycobacterium tuberculosis*
M – Molar
mg – Miligrama
mL – Mililitro
 μ l – Microlitro
mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro
MOI – *Multiplicity of infection*
Mtb – *Mycobacterium tuberculosis*
NaCl – Cloreto de sódio
NaPO₄ – Fosfato de sódio
NaN₃ – Trinitreto de sódio
NDI – Núcleo de Doenças Infecciosas
ng – Nanograma
NK – Células *Natural Killers*
PAMPs – *Pathogen-Associated Molecular Patterns*
PAGE – Gel de poliacrilamida
PBS – *Phosphate Buffered Saline*
PCR – *Polymerase Chain Reaction*
pg – Picograma
pH – Potencial hidrogeniônico
PPD – *Purified Protein Derivative*
RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*
rpm – Rotações por minuto
RPMI – *Roswell Park Memorial Institute medium*
RNase – Ribonuclease
TB – Tuberculose
T-bet – *T-box transcription factor*
TGF- β - *Transforming growth factor beta*
Tho – Célula T *helper naïve*
TLR – *Toll-like receptor*
TMB – Tetrametilbenzidina
TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa
Treg – Células T reguladoras

UFC – Unidade Formadora de Colônia

UV – Ultravioleta

VLDL – *Very low density* lipoproteins

WBKA – *Whole Blood Killing Assay*

WHO/OMS – Organização Mundial de Saúde

WT – *wild type* (selvagem)

SUMÁRIO

1.Introdução.....	15
2.Objetivos.....	23
2.1 Objetivo geral	24
2.2 Objetivos específicos	24
3.Metodologia	25
3.1. Modelo do estudo.....	26
3.2. População do estudo	26
3.2.1.Critérios de inclusão:.....	26
3.2.2.Critérios de Exclusão:	26
3.3 Coleta e conservação das amostras	27
3.4 Seleção e Preparo dos isolados de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	27
3.5 Verificação da concentração bacteriana obtida após descongelamento.....	28
3.5 Ensaios da interferência da Apolipoproteína E na atividade microbica <i>in vitro</i>	28
3.5.1 Imobilização dos anticorpos anti-ApoE em fase sólida ativada	28
3.5.2 Depleção da ApoE por imunoafinidade	29
3.5.3 Isolamento das Células Mononucleadas do Sangue Periférico (CMSP)	29
3.5.4 Infecção e cultura de CMSP	30
3.5.5 Avaliação da atividade microbica	31
3.6. Avaliação da Atividade Microbica (<i>Whole Blood Killing Assay</i>)	32
3.7 Extração do DNA	33
3.8 Tipagem das isoformas das apoE	33
3.9 Detecção e quantificação de citocinas por Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	34
3.10 Detecção e quantificação de ApoE por Ensaio Imunoenzimático (ELISA).....	36
3.11 Infecção e cultura de células do baço WT e nocaute para o gene da APOE	37
3.12 Atividade microbica de esplenócitos WT e nocaute para o gene da APOE	38
3.13 Considerações éticas.....	38

3.14 Análise Estatística	38
4. Resultados.....	40
4.1 Caracterização dos indivíduos estudados	41
4.2 Frequência dos genótipos de APOE nos grupos estudados.....	41
4.3 Atividade microbica dos indivíduos em culturas de sangue total	42
4.4 Atividade microbica na presença ou ausência da ApoE	44
4.5 Perfil de citocinas no sobrenadante das culturas de CMSP infectadas com H37Rv, depletadas ou não de ApoE	46
4.6 Dosagem de ApoE no sobrenadante das culturas de CMSP infectadas com H37Rv, depletadas ou não de ApoE	47
5. Discussão	49
6. Conclusões.....	54
7. Referências	56
8. Anexos.....	65
8.1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	66

1.Introdução

A tuberculose (TB) acompanha o homem desde os períodos mais remotos de sua história. Existem evidências dessa doença desde o início do período Neolítico (NICKLISCH et al., 2012). Aproximadamente 25% das múmias egípcias encontradas apresentam evidências dessa doença (NERLICH; LÖSCH, 2009). Apesar disso, somente em 1882, Robert Koch descreveu o agente etiológico da TB; o *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), o qual também é conhecido como bacilo de Koch (KOCH, 1982).

A tuberculose é a segunda maior causa de morte provocada por apenas um agente infeccioso, perdendo apenas para o HIV/AIDS (WHO, 2012). Apesar dos esforços globais em desenvolver novos métodos diagnósticos, medicamentos e vacinas, a TB, em 2011 acometeu 8,7 milhões de pessoas e levou a óbito 1,4 milhões de pessoas no mundo (WHO, 2012). No Brasil, 73.002 novos casos foram notificados em 2013 (DATASUS, 2014).

A micobactéria causadora da TB, *Mycobacterium tuberculosis* tem sua parede celular constituída por 60% de lipídios, principalmente ácidos micólicos e impede a passagem de medicamentos, desinfetantes e outras substâncias (MISHRA et al., 2011). Em razão da natureza de sua parede, quando corado por carbol-fucsina, não é capaz de ser descorado com álcool ou ácido, sendo assim denominado Bacilo Álcool-Ácido Resistente (BAAR).

A tuberculose é transmitida por via aérea em praticamente a totalidade dos casos, sendo facilitada pela aglomeração humana. Doentes bacilíferos, isto é, aqueles cuja baciloscopia de escarro é positiva, são a principal fonte de infecção. A infecção ocorre a partir da inalação de núcleos secos de tamanho de até 5µm, contendo de um a dois bacilos (Núcleos de Wells) expelidos pela tosse, fala ou espirro de doente com tuberculose de vias respiratórias (pulmonar ou laríngea) ativa, que alcançam os bronquíolos e alvéolos pulmonares. Por ser aéreo estrito, geralmente se instala no lobo superior do pulmão, onde há maior pressão de oxigênio e apresenta uma resposta imune tardia (CAMPOS, 2006; ERNST, 2012; RUSSELL et al., 2009).

Após atingir os alvéolos pulmonares, as células fagocíticas presentes no local, como os monócitos, neutrófilos, macrófagos e células dendríticas (DCs), reconhecem o bacilo por meio de vários tipos de receptores de reconhecimento de padrão, assim como os *Toll-like receptor* (TLR), capazes de se ligar a padrões

moleculares associados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns* – PAMPs) e o fagocitam, ativando os primeiros mecanismos da resposta imune inata, como a produção de citocinas e quimiocinas, responsáveis por atrair outras células deste tipo de resposta. (KANG et al., 2011).

Quando a resposta inata é eficaz na eliminação do bacilo, os indivíduos não apresentam memória imunológica contra o Mtb, mesmo após sucessivas exposições como observado em diversos estudos com profissionais de saúde e contatos domiciliares (MORRISON; PAI; HOPEWELL, 2008; PAI et al., 2006). Isto pode ser explicado pela presença de uma imunidade inata eficaz, a qual elimina o bacilo e torna desnecessária uma reação imunológica adaptativa (BRIGHENTI; ANDERSSON, 2012).

Entretanto, sabe-se que os bacilos possuem mecanismos de evasão, como a inibição da ação de compostos intermediários de formas reativas do oxigênio, inativação de enzimas lisossômicas, modificações no fagolisossoma, diminuição da produção de citocinas inflamatórias e fuga para o citoplasma (CAMPOS, 2006). Desta forma, a resistência à resposta imune inata depende da virulência da cepa inalada e da capacidade microbicida intrínseca dos macrófagos alveolares. Essa susceptibilidade possibilita a replicação do Mtb no interior dos macrófagos, causando sua ruptura e disseminação do bacilo, levando à infecção de outras células (VAN CREVEL; OTTENHOFF; VAN DER MEER, 2002). Assim, com a progressão da infecção, macrófagos e células dendríticas passam para a circulação linfática chegando aos linfonodos, onde apresentam os antígenos micobacterianos aos linfócitos T e B, promovendo a ativação da resposta antígeno-específica, característica da resposta imune adaptativa (KLEINNIJENHUIS et al., 2011).

A interação entre a imunidade inata e a adaptativa e seu estabelecimento adequado, leva a um controle do patógeno e ao estabelecimento de um estágio dormente da infecção, denominado infecção latente. Esta infecção latente é caracterizada pela ausência de sintomas clínicos e pela presença de uma resposta antígeno-específica para o bacilo, reativo ao teste tuberculínico ou em ensaios de liberação de Interferon-gama *in vitro* (QuantiFERON®-TB Gold *in tube*; Cellestis, Victoria, Austrália) (LIN; FLYNN, 2010; REECE; KAUFMANN, 2012).

Células como os linfócitos $\gamma\delta$, TCD4⁺ e TCD8⁺ são determinantes para a manutenção do estado de latência e prevenção da progressão para TB ativa (RUSSELL et al., 2009; SRIDHAR; POLLOCK; LALVANI, 2011). Sabe-se que fatores inerentes ao patógeno e ao hospedeiro, tais como carga bacilar, aumento da disponibilidade de oxigênio, estado imunológico e características genéticas, desempenham papel crucial na evolução para doença ativa (GENGENBACHER; KAUFMANN, 2012).

Comparada a outras infecções, é observado um atraso no estabelecimento de uma resposta imune adaptativa, que emerge por volta de 42 dias após a infecção. Este atraso está relacionado à inibição da apoptose pelo patógeno e uma migração retardada da DCs para o linfonodo, comprometendo a ativação de células TCD4⁺ (URDAHL; SHAFIANI; ERNST, 2011). Os diferentes subtipos de células CD4⁺ auxiliares (Células T *helpers* – Th) Th1, Th2 e Th17, desempenham papéis distintos durante a resposta imune frente ao Mtb. As células Th1 expressam um fator de transcrição denominado *T-box transcription factor* (T-bet) e são capazes de produzir e secretar citocinas tais como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interferon gama (IFN- γ), interleucina 2 (IL-2) e IL-12, as quais ativam macrófagos e neutrófilos e aumentam a produção de anticorpos por células B (IgG). Essa resposta é capaz de conter a infecção e prevenir a doença ativa (LU et al., 2011; SALGAME, 2005). As células Th2, por sua vez, expressam o fator de transcrição GATA-3 (*Trans-acting T-cell-specific transcription factor GATA-3*) e secretam as citocinas IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e IL-25 (KOYASU; MORO, 2013; LI; ZHANG; SUN, 2011) e são associadas à progressão da doença, inibindo a ativação de macrófagos, mecanismos de eliminação do bacilo mediados por autofagia e a proliferação de linfócitos T produtores de IFN- γ (HARRIS et al., 2007; MÉNDEZ-SAMPERIO, 2014). Estudos relatam que a expressão aumentada de citocinas do tipo Th2 levam a um aumento na carga bacteriana, assim como a susceptibilidade ao desenvolvimento da infecção micobacteriana (RAFI et al., 2012). As células produtoras de IL-17 (Th17) se diferenciam na presença de IL-6, IL-1 e IL-23 e sua presença tem sido associada ao recrutamento e persistência de macrófagos e neutrófilos para os pulmões, à formação precoce do granuloma e ao reparo do dano tecidual (TORRADO; COOPER, 2010).

Dentre as células T CD4, estão ainda as células T reguladoras (Treg), que desempenham um papel importante na regulação da resposta imune e indução da tolerância imunológica. São encontradas no sangue periférico e no timo, tanto de camundongos como de seres humanos (SAKAGUCHI; SAKAGUCHI, 2005). As Tregs são conhecidas pela capacidade de modular respostas inflamatórias exacerbadas, por meio de mecanismos como a modulação negativa das células apresentadoras de antígenos (APC), citólise das células T efectoras e secreção de citocinas inibitórias, como a IL-10 e TGF- β (VIGNALI; COLLISON; WORKMAN, 2009). Em relação à TB, uma expansão da população TDC4⁺ CD25⁺ é observada em pacientes com a doença pulmonar ativa, se comparados a indivíduos saudáveis. O aumento dessa população está associado a uma menor produção de IFN- γ por células mononucleares do sangue periférico (CMSP), em modelo de infecção *in vitro* pelo Mtb. A depleção desse tipo celular reestabelece a produção dessa citocina, atingindo níveis semelhantes aos observados em indivíduos saudáveis, com o demonstrado anteriormente por nosso grupo (RIBEIRO-RODRIGUES et al., 2006). Neste contexto, nosso grupo demonstrou um aumento da população de Tregs e uma menor atividade microbicida frente à infecção *in vitro* pelo Mtb em indivíduos reativos ao teste tuberculínico (PPD+) em relação ao grupo PPD- (CAMPANA, 2010; STRINGARI, 2012). Podemos perceber então que existem diferentes tipos de resposta celular frente ao Mtb, as quais podem favorecer a regressão como a progressão da doença. Assim, os mecanismos que levam a essa heterogeneidade de respostas variam e dependem da presença de citocinas no meio durante a estimulação antigênica, afinidade ao antígeno e moléculas coestimuladoras que modulam a função das células T no momento da apresentação de antígenos.

Os componentes da parede celular do *M. tuberculosis*, em sua maioria de natureza lipídica, desempenham um importante papel na imunopatogênese, sendo responsáveis por muitos dos mecanismos de evasão da resposta imune (GOROCICA et al., 2005). Um componente importante na estrutura do bacilo é o ácido micólico, um ácido graxo de cadeia longa altamente hidrofóbico. Estudos demonstram uma grande influência desse composto na viabilidade e integridade do bacilo, em mecanismos de resistência a antimicrobianos (BARKAN et al., 2009; OJHA et al., 2008), bem como na modulação da resposta imune, inibindo

a migração de leucócitos (BLOCH, 1950), induzindo resposta tolerogênica, supressão da inflamação (KORF et al., 2005) e possibilitando diferentes tipos de resposta inata, o que revela seu papel na indução de respostas e interação patógeno-hospedeiro. Moléculas CD1 são responsáveis pela apresentação de lipídeos micobacterianos aos linfócitos T, gerando uma proliferação de uma população CD4⁺ específica, dotada de mecanismos microbicidas, tais como produção de IFN- γ , citólise e liberação de granulinas. Portanto, estes antígenos podem induzir uma resposta celular do tipo Th1 (BRIGL; BRENNER, 2004; MOODY et al., 2000). As moléculas CD1 estão presentes em diferentes compartimentos celulares, agindo como moléculas sentinela para lipídios extracelulares (SUGITA; CERNADAS; BRENNER, 2004). Em paralelo, a Apolipoproteína E (ApoE) também circula pelo compartimento extracelular, mediando o transporte de lipídios. Estudos recentes demonstram que antígenos lipídicos podem ser levados aos compartimentos celulares por meio da ApoE (VAN DEN ELZEN et al., 2005).

A ApoE é uma glicoproteína anfipática de aproximadamente 34 KDa, formada por 299 resíduos de aminoácidos (ZANNIS et al., 1982). Inicialmente foi identificada como constituinte de VLDLs (*Very low density lipoproteins*) e denominada “apoproteína rica em arginina”, mas rapidamente, sua função moduladora no transporte de colesterol foi identificada. A ApoE é produzida principalmente no fígado, baço, rim, pulmões e tecidos musculares (HAVEEL; KANE, 1973; SHORE; SHORE, 1973).

Foram identificadas três isoformas principais de ApoE, que são codificadas pelos alelos $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$, localizados na região cromossômica 19q13. Três fenótipos homozigotos (ApoE2/2, E3/3 e E4/4) e três heterozigotos (ApoE2/3, E2/4, E3/4) provêm da expressão de dois destes três alelos. Existem algumas diferenças bioquímicas em sua cadeia de aminoácidos nas posições 112/158, onde os seguintes aminoácidos diferem: ApoE2 (Cys/Cys), ApoE3 (Cys/Arg), ApoE4 (Arg/Arg) (MAHLEY, 1988). Estas diferenças estruturais existentes nas isoformas da ApoE podem provocar modificações funcionais nos processos metabólicos nos quais esteja envolvida. Após a descoberta destas variações em decorrência do genótipo para ApoE, diversos estudos têm demonstrado associações entre o seu polimorfismo e doenças, tais como, aterosclerose

(GUNGOR et al., 2012), doença de Alzheimer (UROSEVIC; MARTINS, 2008), malária (FUJIOKA et al., 2013), criptosporidiose (AZEVEDO et al., 2014) e tuberculose (WOZNIAK et al., 2009). Isto pode ser justificado pelo fato de que alguns desses patógenos utilizam membros da família de receptores de LDL para entrar nas células. Como as isoformas de ApoE têm diferentes afinidades de ligação a estes receptores, poderia haver uma competição pela ligação a essas moléculas (WINKLER et al., 1999). Portanto, ser portador de alelos específicos pode determinar a extensão da entrada e distribuição do agente infeccioso, resultando na variação do dano causado.

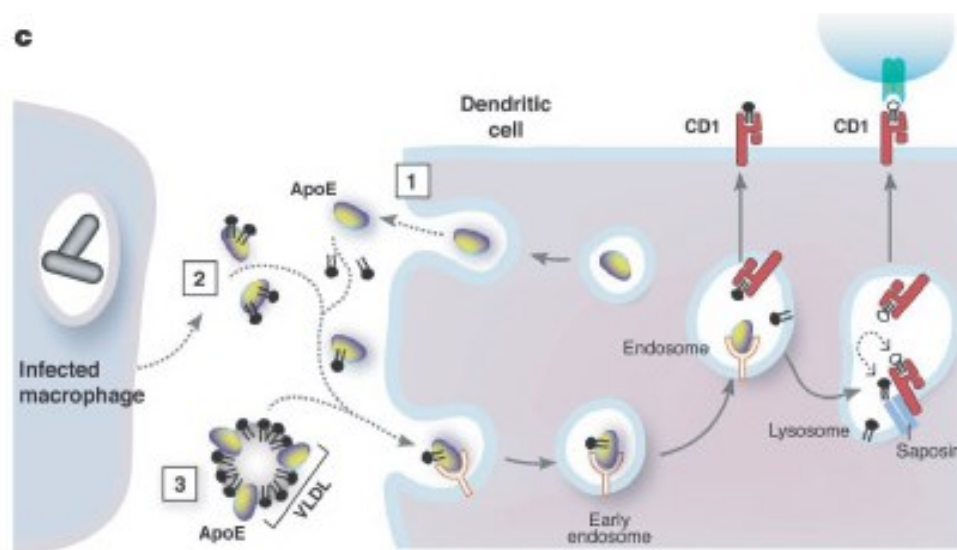


Figura 1: Vias exógenas para apresentação de antígenos lipídicos mediadas pela Apolipoproteína E. Fonte: VAN DEN ELZEN et al., 2005.

Considerando-se que a ApoE pode estar envolvida na apresentação dos antígenos lipídicos, Van den Elzen e colaboradores (2005), propuseram três mecanismos de transporte destes antígenos mediados pela ApoE para o sistema endossomal: 1) secreção-captura, onde a ApoE secretada (ou reciclada pela própria célula) pode capturar antígenos lipídicos e voltar para o interior da célula; 2) células infectadas, tais como os macrófagos, secretam antígenos lipídicos associados com ApoE, que são transportadas para DCs vizinhas não infectadas; e 3) lipoproteínas séricas funcionam como um depósito para antígenos lipídicos, caindo na circulação e estimulando uma resposta em sítios distantes da origem do antígeno.

Neste trabalho, pretendemos estudar os mecanismos envolvidos na interação entre a ApoE e a atividade microbicida frente ao Mtb, em modelo *in vitro* de

infecção, a fim de melhor compreender os mecanismos imunológicos relacionados no direcionamento, desenvolvimento e progressão da infecção.

2.Objetivos

2.1 Objetivo geral

- Verificar a participação da ApoE na atividade microbicida *in vitro* de indivíduos à infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar os diferentes genótipos da ApoE em indivíduos PPD positivos e PPD negativos e pacientes com tuberculose pulmonar ativa.
- Comparar a atividade microbicida entre os indivíduos antes e após a depleção de ApoE;
- Comparar a atividade microbicida dos sujeitos portadores das diferentes isoformas de ApoE;
- Verificar a participação da ApoE em modelo murino;
- Determinar o perfil da produção das citocinas IFN- γ e IL-10 e os níveis séricos de ApoE antes e após a depleção de ApoE;

3.Metodologia

3.1. Modelo do estudo

O presente trabalho é um estudo descritivo, transversal, para verificar a participação da ApoE na atividade microbicida *in vitro* de indivíduos à infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*. O estudo foi conduzido nos laboratórios de Micobacteriologia e de Imunologia Celular e Molecular do Núcleo de Doenças Infecciosas (NDI), localizados no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), de setembro de 2012 a junho de 2014.

3.2. População do estudo

Foram arrolados 34 indivíduos:

- 1) 13 indivíduos PPD negativos;
- 2) 17 indivíduos PPD positivos;
- 3) 4 indivíduos com tuberculose pulmonar ativa

3.2.1. Critérios de inclusão:

- Ter idade maior que 18 anos;
- Se enquadrar em qualquer um dos grupos da pesquisa (PPD-, PPD+, ou TB pulmonar ativa);
- Possuir teste tuberculínico negativo com valor de leitura inferior a 5mm (Grupo1); teste tuberculínico positivo, com valor de leitura superior a 10mm (Grupo 2);

3.2.2. Critérios de Exclusão:

- Pacientes que relatarem uso de medicamentos corticóides nos últimos meses ou anti-inflamatórios não esteróides nas últimas 10 semanas;
- Pacientes HIV positivos ou com alguma outra condição que comprometa sua resposta imunológica.

3.3 Coleta e conservação das amostras

As amostras de sangue foram obtidas utilizando o método de coleta à vácuo em tubo de coleta com heparina sódica. De cada indivíduo, foram coletados 10-20mL de sangue periférico, segundo a necessidade de cada experimento. Este foi utilizado para as avaliações imunológicas do estudo, como estudo da atividade microbicida, bem como dosagens dos níveis de ApoE e genotipagem das suas isoformas.

3.4 Seleção e Preparo dos isolados de *Mycobacterium tuberculosis*

Para o modelo experimental de infecção micobacteriana *in vitro* foi utilizada a cepa ATCC 27294 (H37Rv), referência de cepa virulenta. O isolado a ser estudado foi retirado do armazenamento em freezer a -70 °C e subcultivado para frascos com meio de cultura Ogawa. Após incubação a 37°C por 21 dias, as colônias foram retiradas com alça bacteriológica do meio de cultura e inoculadas em um tubo com pérolas de vidro contendo 2mL de solução PBS (*phosphate buffered saline*) com Tween 80 a 0,05%. Este foi agitado em Vórtex por 1 minuto, com intuito de romper os grumos de bactéria. Em seguida, foi deixado em repouso por 30 minutos. O sobrenadante obtido após esse repouso foi transferido aos poucos para tubos sem pérola de vidro contendo 5mL de PBS com Tween 80 a 0,05%, sempre medindo a densidade óptica (DO) em espectrofotômetro a 265nm, até que se obtivesse uma DO igual a 1. O conteúdo desses tubos foi transferido para um tubo plástico de fundo cônico de 50mL e centrifugado a 6000 rpm, sem freio, durante 30 minutos, afim de formar um depósito que contivesse as micobactérias. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o depósito foi ressuspensionado em 13,76mL de meio 7H9 suplementado com OADC e 6,24mL de solução de PBS com 80% de glicerol. Após homogeneização da suspensão, as micobactérias foram submetidas a 3 ciclos de sonicação em Lysor por 10 segundos, com intervalos de 5 minutos cada, para reduzir os agregados da micobactéria. Finalmente, a suspensão foi armazenada no volume de 0,5mL em criotubos a -70°C. Antes de serem usadas, as bactérias eram retiradas do freezer e descongeladas em estufa a 37°C por uma hora.

3.5 Verificação da concentração bacteriana obtida após descongelamento

Após o completo congelamento das alíquotas, foram descongeladas triplicatas da cepa armazenada, as quais foram utilizadas para verificar a concentração estoque obtida. Para tanto, após descongelamento, realizou-se diluição seriada em RPMI 1640 (*SIGMA-Aldrich*, Missouri, Estados Unidos) Completo (Soro Fetal Bovino Inativado, L-Glutamina, *HEPES* 1M - *Gibco Invitrogen*, Massachusetts, Estados Unidos), da seguinte maneira:

Em dez tubos de vidro, adicionou-se 0,9mL RPMI Completo. No primeiro tubo, foi adicionado 0,1mL da suspensão bacteriana e homogeneizada (diluição 1:10). No segundo, adicionou-se 0,1mL da suspensão preparada no primeiro tubo e homogeneizada (diluição 1:100), e assim sucessivamente, até que se obtivesse uma diluição de proporção $1:10^{-5}$. De cada diluição foram feitos 3 inóculos de 30µL em placas de Petri tripartidas contendo meio *Middlebrook* 7H11 (*Becton Dickinson*, Nova Jérsei, Estados Unidos) enriquecido *Middlebrook* OADC *Enrichment* (*Becton Dickinson*, Nova Jérsei, Estados Unidos) e Glicerol (Vetec, Brasil – $C_3H_5(OH)_3$), que foram incubadas em estufa a 37°C por 21 dias, sendo que no 14° e 21° dias era realizada a contagem das colônias. Assim, o número de colônias observadas foi utilizado para determinar a concentração da suspensão em estoque e a cada experimento foi repetido esse procedimento com o objetivo de manter o Controle da Concentração do Inóculo (CCI).

3.5 Ensaios da interferência da Apolipoproteína E na atividade microbica *in vitro*

3.5.1 Imobilização dos anticorpos anti-ApoE em fase sólida ativada

A depleção da ApoE do plasma foi realizada por meio de uma coluna de imunoafinidade Sepharose 4B ligada a anticorpos policlonais anti-ApoE humana (*Thermo Fisher Scientific*, Massachusetts, Estados Unidos) e ativada por Brometo de Cianogênio (CNBr-activated Sepharose™ 4B – *GE Healthcare*, Connecticut, Estados Unidos), conforme descrito a seguir.

Em um tubo cônico de 15mL foram adicionados 1g de Sepharose™ 4B ativada por CNBr e 10mL de HCl 1mM. A mistura foi homogeneizada e centrifugada por

2 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante, correspondente à solução de HCl, foi descartado ao fim de cada centrifugação. Este procedimento foi repetido 3 vezes, afim de permitir melhor ligação da resina com o anticorpo. Após a última lavagem com HCl, o anticorpo policlonal anti-ApoE, previamente diluído em solução de carbonato de sódio 0,1M, pH 8,3 para concentração de 2mg/mL, foi adicionado à resina e colocado em rotação contínua por 16 horas (*overnight*) a 4°C.

Passado o período de incubação, o tubo foi centrifugado por 2 minutos a 3000 rpm, assim os anticorpos não ligados foram removidos com o sobrenadante. Em seguida, a resina foi lavada com solução de carbonato de sódio 0,1M, pH 8,3. Após a lavagem, adicionou-se 10mL de etanolamina 1M, pH 8,0, afim de bloquear os sítios de ligação que permanecessem ativos na resina. Assim, nova incubação foi feita por 2h a 4 °C. Afim de remover o excesso de etanolamina, a resina foi lavada três vezes alternadamente com tampão Acetato de sódio 0,1M – NaCl 1M, pH 4,0 e com tampão Borato de sódio 0,1M – NaCl 1M, pH 8,0. Por fim, a resina conjugada com o anticorpo anti-ApoE foi armazenada em solução de NaPO₄ 0,01M, pH 7,2 com 0,02% de NaN₃, a 4°C até o momento de seu uso.

3.5.2 Depleção da ApoE por imunoafinidade

As amostras de sangue coletadas foram centrifugadas por 15 minutos a 1500 rpm. Posteriormente, coletou-se 2mL do plasma, que foi incubado com a resina conjugada com anticorpo anti-ApoE sob rotação contínua por 12h (*overnight*) a 4°C. Após incubação, o plasma tratado foi centrifugado por 2 minutos a 3000 rpm, coletado e armazenado para posterior uso. Em seguida, a resina foi incubada por 5 minutos sob rotação contínua com 10mL de Glicina 0,05M – HCl, pH 2,8, foi novamente centrifugada por 2 minutos a 3000 rpm e o sobrenadante foi descartado. A resina foi lavada três vezes com NaPO₄ 0,01M, pH 7,2 e armazenada a 4°C para seu próximo uso.

3.5.3 Isolamento das Células Mononucleadas do Sangue Periférico (CMSP)

Inicialmente, foram transferidos 15mL de sangue anticoagulado (tratados com heparina) para um tubo de fundo cônico de polipropileno de 50mL.

Primeiramente, o sangue era diluído 1:2 em 15mL de PBS e homogeneizado por inversão. Em outro tubo semelhante (50mL) eram adicionados 15ml de *Ficoll-Histopaque 1077* (SIGMA Aldrich, Missouri, Estados Unidos), e o sangue diluído era transferido vagarosamente para esse tubo, formando duas fases distintas, uma composta pelo sangue diluído e a outra pela solução de *Ficoll*. Assim o tubo foi centrifugado a 1400 rpm por 30 minutos em temperatura ambiente e sem freio, para evitar que ocorra a mistura entre as fases. Após a centrifugação temos a formação de três partes. A parte superior, é composta pela separação do plasma com seus constituintes. Entre o plasma e o Ficoll-Histopaque, em uma fase semelhante a uma nuvem de cor esbranquiçada, ficam as células mononucleares. Abaixo ficam os eritrócitos e os granulócitos.

Com o auxílio de uma pipeta Pasteur estéril foram coletadas as células mononucleares localizadas na interface Plasma-Ficoll, e transferidas para um novo tubo de fundo cônico de polipropileno de 50 ml. Em seguida, as células foram lavadas através da adição de PBS 1X, gelado, pH 7.2, o qual foi adicionado até obtermos o volume máximo do tubo e centrifugado a 1.200 rpm por 10 minutos. O sobrenadante era descartado e o processo de lavagem repetido mais duas vezes.

Ao final do processo, as células eram ressuspensas em um volume conhecido de RPMI 1640 (10mL) e contadas em câmara de Neubauer. Após a contagem, as células eram divididas em dois tubos. O primeiro era mantido como controle intacto e ressuspenso em RPMI suplementado com o plasma do paciente contendo ainda ApoE. O segundo tubo, recebia o RPMI suplementado com o plasma que foi submetido à coluna de imunoafinidade para retirada da ApoE. A concentração de células era ajustada para 10^6 células/mL, considerando uma frequência média de 10% de macrófagos.

3.5.4 Infecção e cultura de CMSP

Para a infecção das CMSP, utilizou-se uma diluição das bactérias já armazenadas, para que MOI (*multiplicity of infection*) fosse de 1 bactéria para 1 macrófago (MOI de 1:1), considerando-se o valor normal de 10^6 leucócitos em um indivíduo, dos quais cerca de 10% são monócitos (10^5). Assim, 8 microtubos

plásticos de fundo cônico foram identificados para cada indivíduo. Os tubos controle (dois inalterados e dois com depleção de ApoE), recebiam 1mL da suspensão de CMSP em RPMI suplementado com seu próprio plasma, sendo esse plasma intacto ou tratado pela coluna de imunoafinidade. Aos demais, além de adicionar-se a suspensão de CMSP e o plasma tratado ou não, foi também adicionada a suspensão bacteriana da cepa escolhida para estudo (H37Rv). Em seguida, os tubos foram incubados a 37°C e 5% de CO₂, sob rotação contínua, por 4 e 72 horas e eram utilizados em cada tempo para o experimento de atividade microbica.

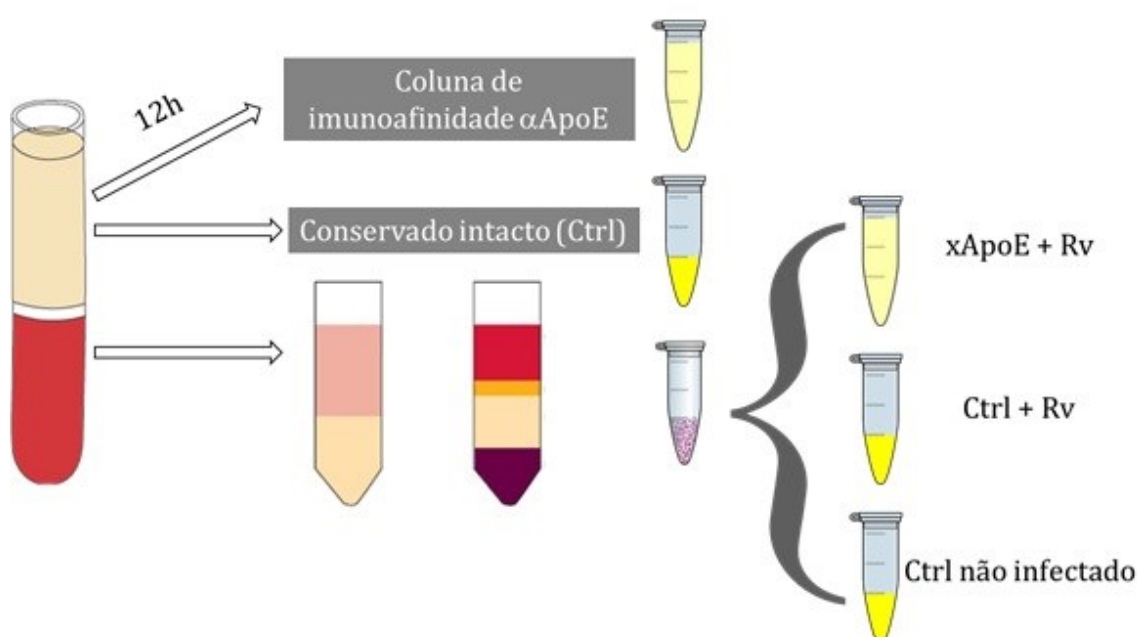


Figura 2: Esquema da metodologia utilizada para os ensaios da interferência da ApoE na atividade microbica *in vitro*.

3.5.5 Avaliação da atividade microbica

Após a incubação, os tubos eram centrifugados por 5 minutos a 13000 rpm e aproximadamente 500µL do sobrenadante eram retirados. Este era armazenado a -70°C para posterior dosagem de citocinas e ApoE. Aos tubos de cultura, adicionava-se 900µL de água estéril, afim de promover a lise das células e consequente liberação das micobactérias fagocitadas. Após breve agitação em vórtex e 10 minutos de incubação à temperatura ambiente, os tubos eram centrifugados por 10 minutos a 13000 rpm e então 800µL do sobrenadante eram descartados. Do volume restante era feita uma diluição seriada em PBS com

Tween 80 a 0,05%. Das quatro diluições realizadas, apenas as três últimas eram inoculadas em placas de Petri contendo meio *Middlebrook 7H11* (*Becton Dickinson*, Nova Jérsei, Estados Unidos) enriquecido *Middlebrook OADC Enrichment* (*Becton Dickinson*, Nova Jérsei, Estados Unidos) e Glicerol (Vetec, Brasil – $C_3H_5(OH)_3$). Em seguida, as placas de Petri eram colocadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂, mantidas por 21 dias, sendo que no 14° e 21° dia era realizada a contagem de unidades formadoras de colônia.

3.6. Avaliação da Atividade Microbicida (*Whole Blood Killing Assay*)

Para a infecção do sangue total, utilizou-se a diluição de bactéria para que MOI (*multiplicity of infection*) fosse de 1 bactéria para 1 macrófago (MOI de 1:1), considerando-se o valor normal de 10⁶ leucócitos em um indivíduo, dos quais cerca de 10% são monócitos (10⁵). Assim, 4 microtubos plásticos de fundo cônico foram identificados para cada indivíduo. O primeiro, correspondente ao tubo controle, recebia uma mistura de 500µL de sangue e 500µL de RPMI Completo. Aos demais, além de adicionar-se igual mistura de sangue e RPMI, foi também adicionada a suspensão bacteriana da cepa escolhida para estudo (H37Rv). Em seguida, os tubos foram incubados a 37°C e 5% de CO₂, sob rotação contínua, por 4 e 72 horas e eram utilizados em cada tempo para o experimento de atividade microbicida.

Após a incubação, os tubos eram centrifugados por 5 minutos a 13000 rpm e aproximadamente 500µL do sobrenadante eram retirados. Este era armazenado a -70°C para posterior dosagem de citocinas e apoE. Aos tubos de cultura, adicionava-se 900µL de água estéril, afim de promover a lise das células e consequente liberação das micobactérias fagocitadas. Após breve agitação em vórtex e 10 minutos de incubação à temperatura ambiente, os tubos eram centrifugados por 10 minutos a 13.000 rpm e então 800µL do sobrenadante eram descartados. Do volume restante era feita uma diluição seriada em PBS com Tween 80 a 0,05%. Das quatro diluições realizadas, apenas as três últimas eram inoculadas em placas de Petri contendo meio *Middlebrook 7H11* (*Becton Dickinson*, Nova Jérsei, Estados Unidos) enriquecido *Middlebrook OADC Enrichment* (*Becton Dickinson*, Nova Jérsei, Estados Unidos) e Glicerol (Vetec,

Brasil – $C_3H_5(OH)_3$). Em seguida, as placas de Petri eram colocadas em estufa a 37°C com 5% de CO_2 , mantidas por 21 dias, sendo que no 14° e 21° dia era realizada a contagem de unidades formadoras de colônia.

3.7 Extração do DNA

O sangue coletado foi centrifugado a 1500 rpm por 15 minutos. Em seguida, 200µL do creme leucocitário foram utilizados para realizar a extração do DNA utilizando o *PureLink™ Genomic DNA Mini Kit* (Life Technologies, Califórnia, Estados Unidos), segundo as instruções do fabricante. Em resumo, ao creme leucocitário, foram adicionados 20µL de Proteinase K e 20µL de RNase A. A mistura foi agitada em vórtex e incubada a temperatura ambiente por 2 minutos. Em seguida, 200µL de *Genomic Lysis/Binding buffer* eram adicionados, novamente agitada em vórtex e incubada a 55°C, promovendo a digestão das proteínas. Afim de provocar a lise das células, adicionou-se 200µL de etanol absoluto e homogeneizou-se a mistura em vórtex. Este preparado foi colocado em uma coluna e centrifugado a 7.997 rpm por um minuto. O tubo coletor foi substituído por um novo e à coluna foram adicionados 500µL de *Wash Buffer 1*, seguido de nova centrifugação. Após a substituição do tubo coletor, 500µL de *Wash Buffer 2* foram adicionados e foi centrifugada a 11.588 rpm por três minutos. Assim, o tubo coletor foi descartado e a coluna foi colocada sobre um tubo *ependorf* estéril. Foram adicionados 25µL de *Genomic Elution Buffer* e após incubação de um minuto, centrifugou-se a 11.588 rpm por um minuto. Este último passo foi repetido e as amostras assim obtidas foram armazenadas a -20°C até o momento do uso.

3.8 Tipagem das isoformas das apoE

A tipagem foi realizada utilizando a metodologia descrita por HIXSON; VERNIER, 1990, com modificações. O DNA genômico de leucócitos, previamente extraído, foi amplificado através da reação em cadeia da polimerase

(PCR) em um termociclador *Applied Biosystems® GeneAmp® PCR System 9700*, utilizando os *primers* 5'-ACAGAATTGCCCCGGCCTGGTACAC-3' e 5'-TAAGCTTGGCACGGCTGTCCAAGGA-3'. Utilizou-se um programa para amplificação das sequências, que consistia em um ciclo inicial por 10 minutos a 94°C para desnaturação, seguido de 32 ciclos compostos por 3 etapas, sendo a primeira de 30 segundos a 94°C para desnaturação, a segunda de 30 segundos a 56°C para anelamento e a terceira de 1 minuto a 72°C para extensão e um ciclo final de 4 minutos a 72°C para extensão. O material amplificado foi submetido em seguida à digestão pela enzima de restrição *HhaI* por 3 horas a 37°C. Para visualização das diferentes bandas, o produto da reação foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) 12%, por 4h, sob corrente constante (125 V). Em seguida, o gel foi corado com brometo de etídeo e os fragmentos de DNA (RFLP) foram visualizados por luz UV e fotodocumentados em fotodocumentador MiniBIS Pro (*DNR Bio-Imaging Systems*). Os tamanhos dos fragmentos foram estimados tendo como padrão de comparação o marcador de peso molecular de tamanho conhecido *GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder* (*Thermo Scientific*, Califórnia, Estados Unidos).

3.9 Detecção e quantificação de citocinas por Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

Para o ensaio imunoenzimático, foi utilizado o teste *Human ELISA Ready-SETGo!* (*EBioscience, Inc. California, San Diego*, Estados Unidos). Desta forma, os sobrenadantes de cultura de 4 e 72 horas foram devidamente armazenadas a -70°C e foram utilizadas para quantificação de IL-10 e IFN- γ . O teste baseia-se na utilização de anticorpos monoclonais para cada um dos marcadores acima e foi utilizado seguindo as recomendações do fabricante.

Primeiramente, microplacas de 96 poços de alta afinidade (COSTAR 9018 – *Corning Life Sciences*, Nova Iorque, Estados Unidos), foram sensibilizadas utilizando-se 50 μ L/poço de uma solução de anticorpos monoclonais de captura (250X), diluídos em uma solução tamponada (*Coating Buffer* 1x) e permaneceram por um período de 12 horas (*overnight*) a 4°C. Após a incubação

as placas foram lavadas cinco vezes com 300µL/poço de uma solução com PBS 1X e 0,05% de Tween-20, entre cada lavagem foi respeitado o tempo de um minuto (“Tempo de molho”). Terminada a lavagem, foi iniciado o bloqueio de sítios inespecíficos da placa, adicionando aos poços 200µL de solução diluente (*Assay Diluent* 1X), com a finalidade de preencher os espaços não ocupados pelo anticorpo de captura. A placa foi incubada por 1 hora em temperatura ambiente e lavada novamente, seguindo o processo descrito anteriormente.

Em seguida, foram adicionados 50µL de amostra em cada poço, sendo que as amostras foram previamente diluídas 10 vezes com solução diluente (*Assay Diluent* 1X), e os valores ajustados após a dosagem utilizando-se o fator de diluição de 10X. Nesta etapa também foi preparada a curva padrão a partir de diluições seriadas (1:2) da solução padrão de cada teste (*Top standard solution*). A diluição para a curva padrão foi realizada respeitando a sensibilidade pré-estabelecida de cada teste (*Standard Curve Range*) sendo de 300 pg/mL a 2 pg/mL para IL-10 e 500 pg/mL a 4 pg/mL para IFN-γ. Em todas as dosagens foram utilizados poços com o branco do teste (50µL de *Assay Diluent* 1X). Após a aplicação das amostras e padrões, as placas foram incubadas por 2h em temperatura ambiente e lavadas cinco vezes com 300 µL/poço de uma solução com PBS 1X e 0,05% de Tween-20. Em seguida, foram adicionados 50 µL/poço do anticorpo de detecção (250X), diluídos em *Assay Diluent* 1X, e as placas foram novamente incubadas por uma 1h, seguida de novas lavagens. Foi então adicionado 50µL/poço de uma solução de avidina-HRP (250X) diluída, incubando-se por 30 minutos. As placas foram lavadas sete vezes, com tempo de molho de 1 a 2 minutos e adicionou-se 50 µL/poço de uma solução substrato TMB 1X (Tetrametilbenzidina). Após 15 minutos foi adicionado aos poços 25 µL da solução de parada (H₃PO₄ [1M]) e realizou-se a leitura em leitor de placa SpectraMax M3 (*Molecular Devices*, Califórnia, Estados Unidos) utilizando a diferença entre os comprimentos de onda de 570nm e 450nm. Os valores obtidos com o padrão foram utilizados para a construção da equação da reta. Os resultados das amostras foram submetidos na equação da reta.

3.10 Detecção e quantificação de ApoE por Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

Para o ensaio imunoenzimático, foi utilizado o teste *ELISA for Human Apolipoprotein E* (Mabtech AB, Nacka Strand, Sweden). Desta forma, os sobrenadantes de cultura de 4 e 72 horas foram devidamente armazenados a -70°C e foram utilizadas para quantificação de Apolipoproteína E. O teste baseia-se na utilização de anticorpos monoclonais e foi utilizado seguindo as recomendações do fabricante.

Primeiramente, microplacas de 96 poços de alta afinidade (COSTAR 9018 – Corning Life Sciences, Nova Iorque, Estados Unidos), foram sensibilizadas utilizando-se 100µL/poço de uma solução de anticorpo monoclonal de captura, diluído em uma concentração de 2µg/mL em PBS pH 7.4 e permaneceram por um período de 12 horas (*overnight*) a 4°C. Após a incubação as placas foram lavadas duas vezes com 300µL/poço de uma solução com PBS 1X, entre cada lavagem foi respeitado o tempo de um minuto (“Tempo de molho”). Terminada a lavagem, foi iniciado o bloqueio de sítios inespecíficos da placa, adicionando aos poços 200µL de PBS com 0,05% Tween 20 contendo 0,1% de BSA (*incubation buffer*). A placa foi incubada por 1 hora em temperatura ambiente e lavada cinco vezes com PBS com 0,05% Tween. Em seguida, foram adicionados 100µL de amostra em cada poço, sendo que as amostras foram previamente diluídas 1000 vezes com *incubation buffer*. Nesta etapa também foi preparada a curva padrão a partir de diluições seriadas da solução padrão do teste, que seguiram um intervalo de concentração de 10 a 0,1ng/mL. Em todas as dosagens foram utilizados poços com o branco do teste (100µL de *incubation buffer*). Após a aplicação das amostras e padrões, as placas foram incubadas por 12h (*overnight*) a 4°C e lavadas cinco vezes com PBS com 0,05% Tween. Em seguida, foram adicionados 100 µL/poço do anticorpo de detecção, diluído em *incubation buffer* para a concentração de 1µg/mL, e as placas foram novamente incubadas por uma 1h, seguida de novas lavagens. Foram então adicionados 100µL/poço de uma solução de avidina-HRP diluída 1000X, que foi lavada novamente somente após uma hora de incubação em temperatura ambiente. Após a lavagem, adicionou-se 100 µL/poço de uma solução substrato

TMB 1X (Tetrametilbenzidina). Após 15 minutos foi adicionado aos poços 50 μ L da solução de parada (H_3PO_4 [1M]) e realizou-se a leitura em leitor de placa SpectraMax M3 (*Molecular Devices*, Califórnia, Estados Unidos) utilizando a diferença entre os comprimentos de onda de 570nm e 450nm. Os valores obtidos com o padrão foram utilizados para a construção da equação da reta. Os resultados das amostras foram submetidos na equação da reta e corrigidos de acordo com o fator de diluição.

3.11 Infecção e cultura de células do baço WT e nocaute para o gene da APOE

Células de baço de camundongo da linhagem C57BL/6 (WT) e de camundongos nocaute para o gene da Apoe (APOE^{-/-}) foram gentilmente cedidas para esse experimento pelo professor Daniel Cláudio de Oliveira Gomes (Universidade Federal do Espírito Santo). Para a infecção dos esplenócitos, utilizou-se a diluição de bactéria para que MOI (*multiplicity of infection*) fosse de 1 bactéria para 1 célula (MOI de 1:1). A concentração foi ajustada para 1×10^6 esplenócitos/mL e para essa metodologia foram utilizadas células normais e células nocaute para o gene da APOE. Assim, 1 mL de suspensão de esplenócitos foi colocado em microtubos plásticos de fundo cônico e foram identificados para cada indivíduo. O primeiro, correspondente ao tubo controle, recebia apenas a suspensão de células em DMEM. Aos demais tubos, além de adicionar-se a suspensão de células em DMEM, foi adicionada a suspensão bacteriana da cepa escolhida para estudo (H37Rv). Em seguida, os tubos foram incubados a 37°C e 5% de CO_2 , sob rotação contínua, por 4 e 72 horas e eram utilizados em cada tempo para o experimento de atividade microbicida.

3.12 Atividade microbica de esplenócitos WT e nocaute para o gene da APOE

Após a incubação, os tubos eram centrifugados por 5 minutos a 13.000 rpm e aproximadamente 500µL do sobrenadante eram retirados. Aos tubos de cultura, adicionava-se 900µL de água estéril, afim de promover a lise das células e consequente liberação das micobactérias fagocitadas. Após breve agitação em vórtex e 10 minutos de incubação à temperatura ambiente, os tubos eram centrifugados por 10 minutos a 13.000 rpm e então 800µL do sobrenadante eram descartados. Do volume restante era feita uma diluição seriada em PBS com Tween 80 a 0,05%. Das quatro diluições realizadas, apenas as três últimas eram inoculadas em placas de Petri contendo meio *Middlebrook 7H11* (*Becton Dickinson*, Nova Jérsei, Estados Unidos) enriquecido *Middlebrook OADC Enrichment* (*Becton Dickinson*, Nova Jérsei, Estados Unidos) e Glicerol (Vetec, Brasil – C₃H₅(OH)₃). Em seguida, as placas de Petri eram colocadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂, mantidas por 21 dias, sendo que no 14° e 21° dia era realizada a contagem de unidades formadoras de colônia.

3.13 Considerações éticas

Todos os procedimentos deste estudo foram realizados de acordo com as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos. A aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde(CEP) foi obtida em 30 de agosto de 2012, sob número de registro 04052512.6.0000.5060. Todos os voluntários receberam um termo de consentimento, que foi assinado pelo mesmo, testemunhas e pelo investigador.

3.14 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram analisados utilizando o teste T pareado para as análises dentro dos grupos relacionadas ao tempo de experimento e o teste T não pareado para relações intergrupos. Para o cálculo do equilíbrio de Hardy-Weinberg da população e comparação da frequência alélica entre os grupos, utilizamos o teste χ^2 , sendo que para o último aplicamos correção de Fisher. Os dados com $p < 0,005$ foram considerados significantes. Para os dados do ensaio

de ELISA foi utilizado o *Microsoft Office Excel* para confecção da equação da reta e do cálculo referente às concentrações encontradas, a análise estatística foi realizada pelo *GraphPad Prism 5*.

4. Resultados

4.1 Caracterização dos indivíduos estudados

Trinta e quatro indivíduos foram arrolados para nosso estudo, sendo 13 PPD-, 17 PPD+ e 4 pacientes com diagnóstico de tuberculose pulmonar ativa. Dados demográficos desses indivíduos são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Dados demográficos dos indivíduos arrolados neste estudo.

Grupos	N	Sexo	Idade (média +/- desvio padrão)
PPD-	8	Feminino	29 ± 7
	5	Masculino	34,8 ± 16,5
PPD+	11	Feminino	35,6 ± 10,4
	6	Masculino	29,1 ± 9,4
TB	1	Feminino	32
	3	Masculino	37 ± 7,8

4.2 Frequência dos genótipos de APOE nos grupos estudados

Em nosso estudo, assim como para a maior parte das populações, o genótipo da ApoE $\epsilon_3\epsilon_3$ foi o mais prevalente (56,76%), seguido pelo $\epsilon_2\epsilon_3$ (18,92%), $\epsilon_3\epsilon_4$ (16,22%), $\epsilon_2\epsilon_4$ (5,41%) e $\epsilon_2\epsilon_2$ (2,70%). A população estudada encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p = 0,5762$). Nenhum indivíduo com o genótipo $\epsilon_4\epsilon_4$ foi encontrado dentre os arrolados neste trabalho. No grupo PPD-, observamos indivíduos com o genótipo $\epsilon_3\epsilon_4$, $\epsilon_3\epsilon_3$, $\epsilon_2\epsilon_2$ e $\epsilon_2\epsilon_4$, sendo que os dois últimos foram encontrados apenas entre os indivíduos desse grupo. Já nos grupos PPD+ e TB, apenas os genótipos $\epsilon_3\epsilon_3$, $\epsilon_3\epsilon_4$ e $\epsilon_2\epsilon_3$ foram encontrados, sendo o último ($\epsilon_2\epsilon_3$) encontrado exclusivamente para esses grupos.

As frequências relativas dos alelos para cada grupo se encontram na Tabela 2. Não encontramos diferenças significantes de frequência dos alelos entre os grupos ($p = 0,4164$).

Tabela 2: Frequência relativa dos alelos, dividida por grupos

Alelos	PPD-	PPD+	TB
$\epsilon 2$	15,38%	15%	12,5%
$\epsilon 3$	65,38%	80%	75%
$\epsilon 4$	19,23%	5%	12,5%

A Figura 3 corresponde a um gel de poliacrilamida 12% feito para a detecção dos fragmentos produzidos pela digestão com a enzima de restrição.

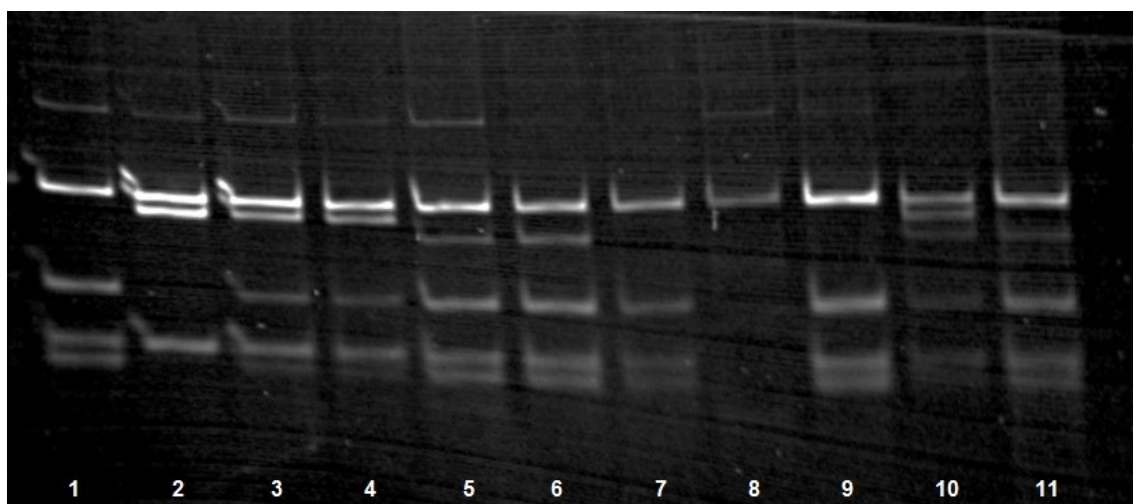


Figura 3: Gel de poliacrilamida do RFLP. Colunas de 1 a 8: Amostras de pacientes; Coluna 9: Padrão APOE $\epsilon 3\epsilon 3$; Coluna 10: Padrão APOE $\epsilon 2\epsilon 4$; Coluna 11: Padrão APOE $\epsilon 3\epsilon 4$.

4.3 Atividade microbicida dos indivíduos em culturas de sangue total

Com o objetivo de avaliar a atividade microbicida nos grupos estudados e uma possível influência das isoformas da ApoE nos mecanismos de defesa contra o Mtb, realizamos o ensaio de Atividade Microbicida no Sangue Total (*Whole Blood Killing Assay - WBKA*). Observamos que o grupo PPD+ apresentou maior carga bacilar que o grupo PPD-, demonstrando uma melhor atividade microbicida do segundo grupo ($p=0,010$).

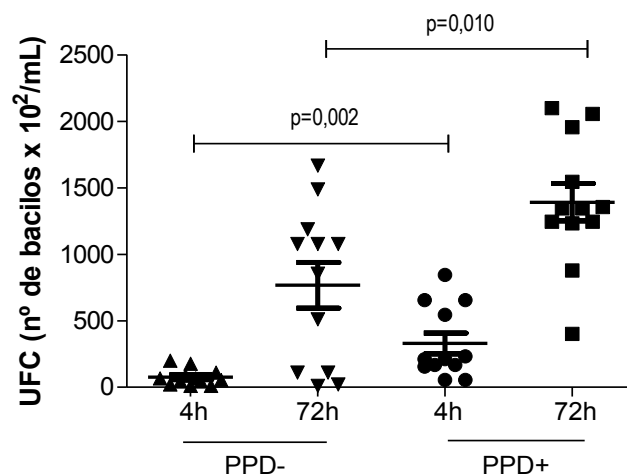


Figura 4: Análise quantitativa do número de unidades formadoras de colônias (UFC) a partir de ensaios WBKA em amostras de sangue total de indivíduos PPD- (n=12) e PPD+(n=12). Resultados de cada um dos grupos refletem as UFCs encontradas, após 4 e 72hs de incubação.

Em seguida, os indivíduos foram agrupados por meio do seu genótipo de ApoE, com o objetivo de observar uma possível influência destes no número de unidades formadoras de colônias, e uma possível correlação entre os genótipos e a capacidade microbicida dos indivíduos.

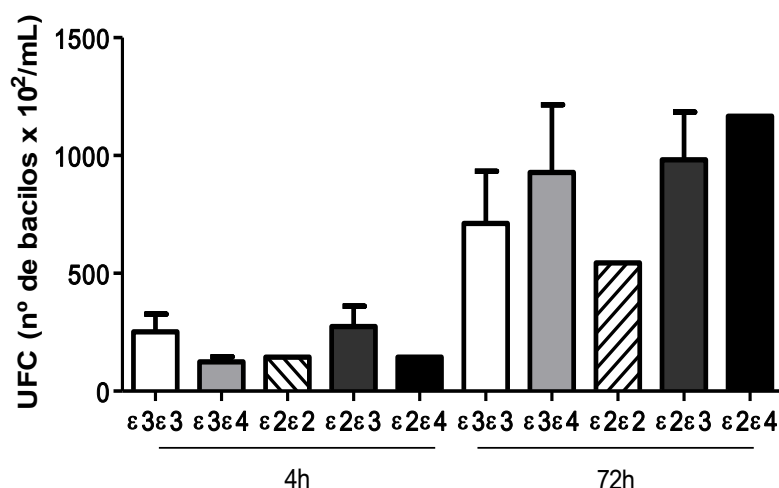


Figura 5: Atividade microbicida em culturas de sangue total de indivíduos portadores de diferentes genótipos, incubadas por 4 e 72 horas com a cepa H37Rv. Os resultados estão expressos em média da concentração bacilar (UFC/ml) e desvio padrão para cada grupo analisado.

Não encontramos diferenças estatisticamente significativas nesta análise, sugerindo pelo menos na população estudada em nosso trabalho, os diferentes genótipos não influenciaram na atividade microbica. No entanto, mais estudos são necessários para melhor avaliar a esta influência.

4.4 Atividade microbica na presença ou ausência da ApoE

Afim de avaliar o papel da ApoE na atividade microbica, independente da sua isoforma, dois experimentos distintos foram realizados: 1) ensaio com células mononucleares do sangue periférico humanos, na presença de plasma depletado ou não de ApoE, e 2) ensaio com esplenócitos de camundongos C57BL/6 *versus* camundongos APOE nocaute (APOE^{-/-}).

Dessa forma, nos experimentos com células humanas, no grupo em que a ApoE presente no plasma foi depletada por meio de pela coluna de imunoafinidade encontramos uma maior carga bacilar após 72 horas, sugerindo que a ApoE possa estar associado a uma maior eficiência da atividade microbica.

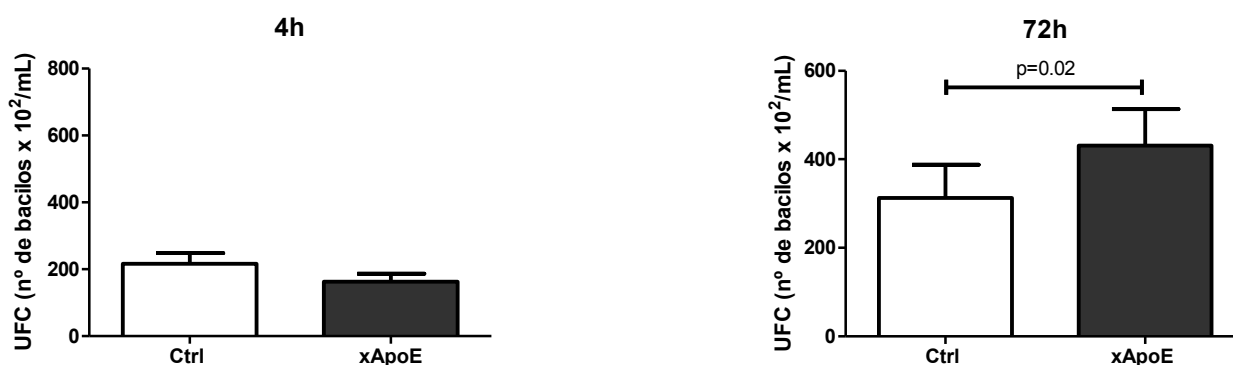


Figura 6: Atividade microbica em culturas de CMSP na presença de plasma depletado de ApoE ou não depletado utilizando coluna de imunoafinidade, incubadas por 4 e 72h com H37Rv.

Como a depleção de ApoE, não elimina essa molécula, utilizamos um modelo experimental murino para confirmar nossos achados. Para tal, realizamos experimentos utilizando camundongos nocaute *para ApoE* para avaliar a atividade microbica *in vitro*. Nesse modelo a ausência da ApoE era completa, já que nestes animais o gene da APOE é inativo. Conforme observado na Figura

7, o desafio *in vitro* dos esplenócitos frente ao Mtb mostrou resultados idênticos ao perfil observado no modelo humano, confirmando nossa hipótese de que a presença de ApoE pode aumentar a atividade microbicida contra o Mtb.

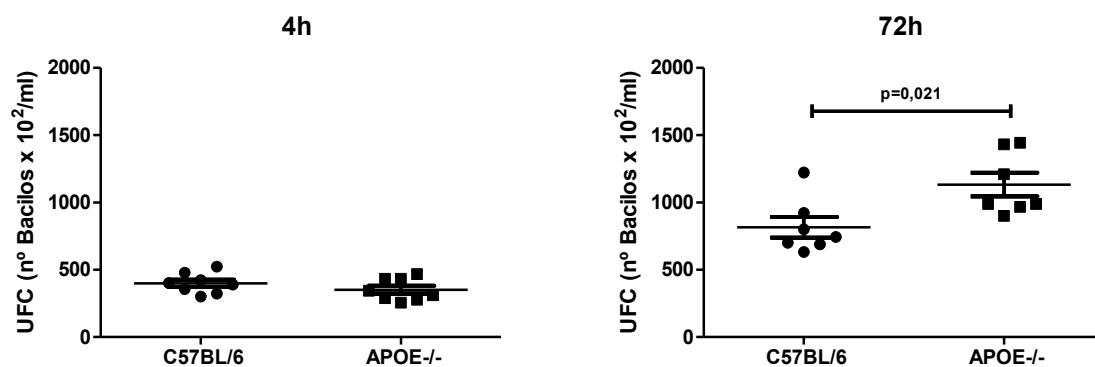


Figura 7: Atividade microbicida *in vitro* de esplenócitos de camundongos C57BL/6 e APOE^{-/-}, incubados por 4 e 72h com H37Rv.

A sobreposição das retas formadas pelas medianas de cada grupo, de cada experimento (Figura 8), permite uma melhor observação destes resultados e mostram que a ApoE possui papel importante na ativação da resposta imune frente ao bacilo da tuberculose, tanto em modelo humano quanto modelo murino.

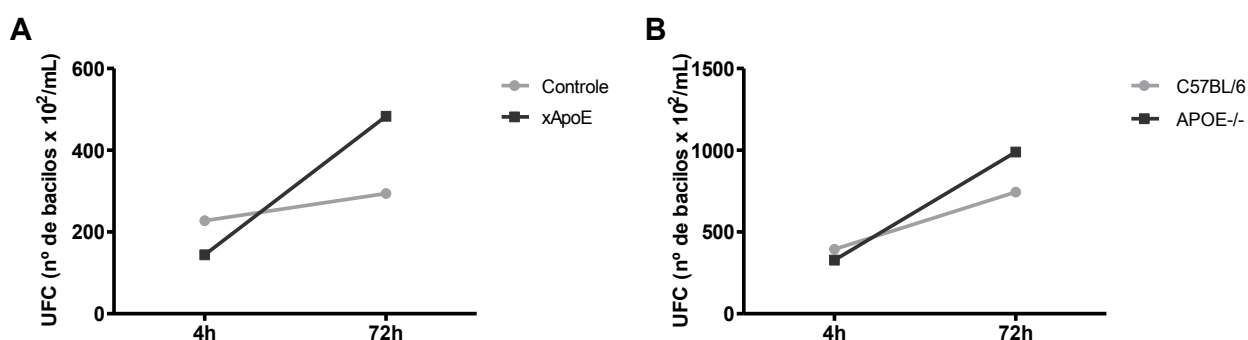


Figura 8: Perfil das medianas dos valores de UFC obtidos por cada grupo, após incubação por 4 e 72h com H37Rv. Em A, observamos os resultados do experimento com células humanas, na presença de plasma com ApoE ou depletado. Em B, observamos os resultados do experimento utilizando células murinas, nocaute ou não para APOE.

4.5 Perfil de citocinas no sobrenadante das culturas de CMSP infectadas com H37Rv, depletadas ou não de ApoE

Considerando as diferenças encontradas nos ensaios de atividade microbicida entre os grupos com ApoE e depletados desta lipoproteína, e que citocinas são moléculas essenciais para o direcionamento e função adequada da resposta imune, verificamos a influência da ApoE na modulação da produção de citocinas no sobrenadante do ensaio de atividade microbicida dos grupos PPD- e PPD+. Para tanto, utilizamos o kit *Human ELISA Ready-SETGo!* (EBioscience, Inc. California, San Diego, USA) das citocinas IFN- γ e IL-10.

A primeira citocina analisada foi o IFN- γ , a qual é essencial para o estabelecimento de uma resposta do tipo Th1, sendo considerada protetora contra o Mtb. Como podemos observar na Figura 9, os indivíduos PPD+ apresentaram uma tendência para maior produção dessa citocina, mesmo no grupo não infectado, independentemente do tempo de incubação. Em ambos os grupos, houve uma tendência à diminuição da produção dessa citocina quando a ApoE foi depletada, sugerindo a sua possível participação na modulação da produção dessa molécula.

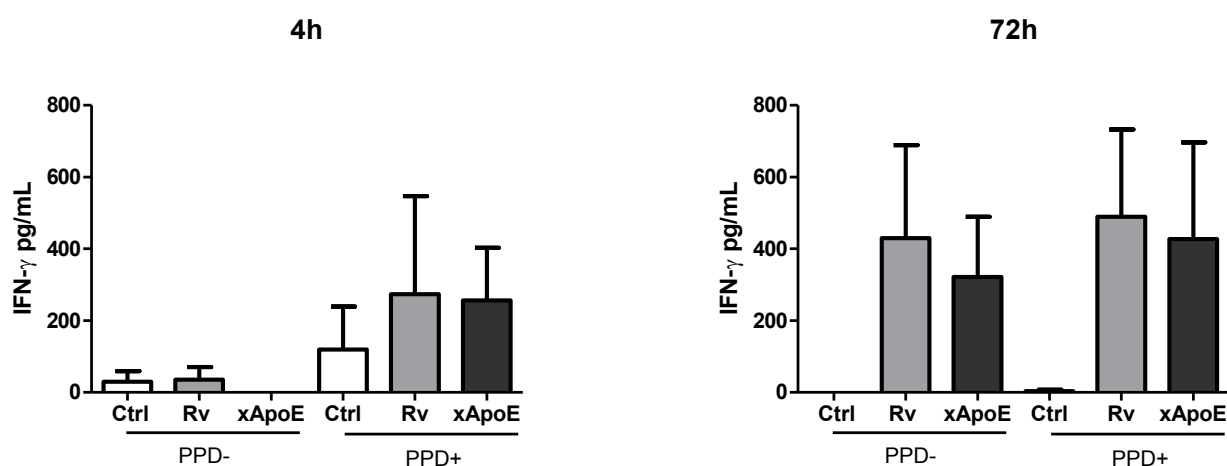


Figura 9: Nível de Interferon gama em sobrenadante de culturas de CMSP de indivíduos PPD+ e PPD- infectadas com a cepa H37Rv após 4 e 72h de infecção, na presença de plasma depletado ou não. Os resultados estão expressos em média de concentração da citocina (pg/ml) e desvio padrão para cada grupo analisado.

Em indivíduos PPD-, a IL-10 apresentou um aumento significativo nos dois grupos infectados (Rv e xApoE) em relação ao grupo não infectado (Ctrl) após 72 horas. Por outro lado, no grupo PPD+, após 72 horas, houve uma redução significativa na produção dessa citocina, no grupo onde a ApoE foi depletada (xApoE) em relação ao controle infectado (Rv), tendência também observada no grupo PPD-.

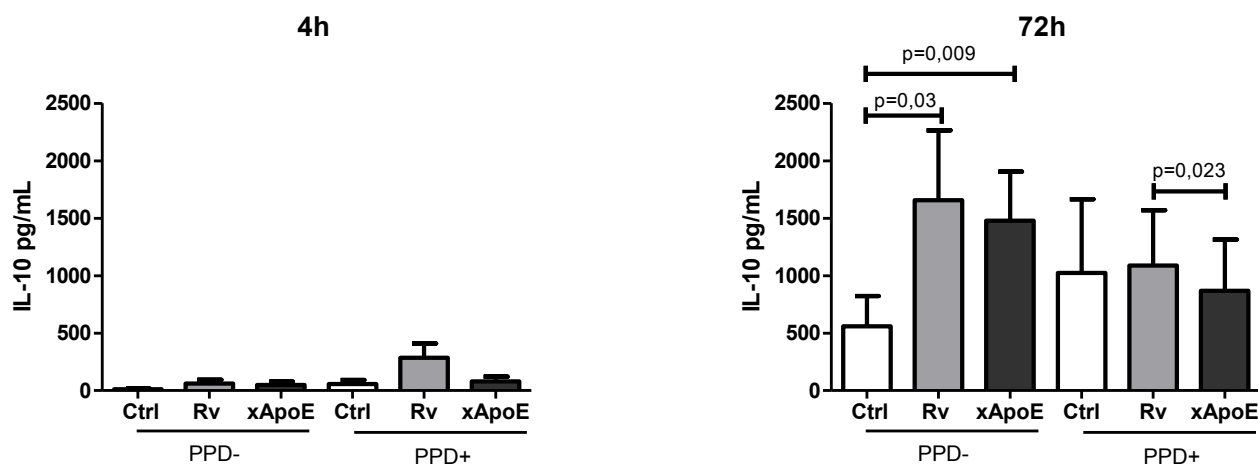


Figura 10: Interleucina 10 em sobrenadante de culturas de CMSP de indivíduos PPD+ e PPD- infectadas com a cepa H37Rv após 4 e 72h de infecção, na presença de plasma depletado ou não de ApoE. Os resultados estão expressos em média de concentração da citocina (pg/ml) e desvio padrão para cada grupo analisado

4.6 Dosagem de ApoE no sobrenadante das culturas de CMSP infectadas com H37Rv, depletadas ou não de ApoE

Com o objetivo de verificar a dinâmica da concentração da ApoE durante a infecção *in vitro* pelo Mtb, realizamos sua dosagem nos sobrenadantes de cultura nos grupos depletadas de ApoE ou não. O poder de depleção desta coluna foi de aproximadamente 30%, assim como confirmado pelas dosagens dos plasmas feitas por ELISA. No grupo PPD+, após 4h de incubação, observou-se uma menor concentração de ApoE dos grupos infectados (Rv e xApoE) em relação ao grupo controle (Ctrl). Após 72h de incubação, observamos uma diminuição significativa destes níveis no grupo não infectado (Ctrl), tendência seguida pelos

outros grupos, até mesmo no grupo PPD-, sugerindo um possível consumo ou mobilização dessa proteína durante a infecção *in vitro*.

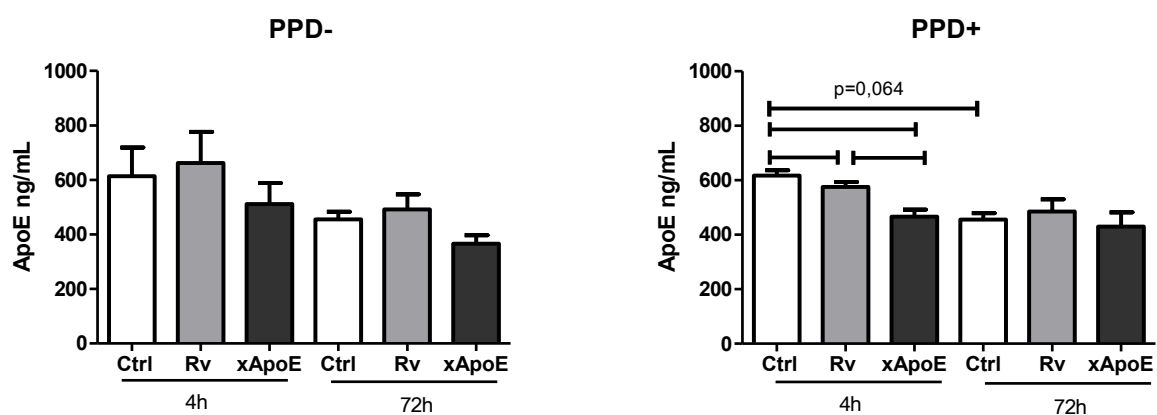


Figura 11: Nível de ApoE em sobrenadante de cultura de CMSP infectadas com Mtb, na presença de plasma tratado ou não por coluna de imunoafinidade, após 4 e 72h de incubação. Os resultados estão expressos em média de concentração (ng/ml) e desvio padrão para cada grupo analisado.

5. Discussão

A Apolipoproteína E foi descrita no começo dos anos 70, como componente do VLDL plasmático humano (SHORE; SHORE, 1973) sendo logo a seguir demonstrado que esta molécula teria um papel importante no equilíbrio do metabolismo do colesterol (HAVEL; KANE, 1973). Alguns anos mais tarde, foi descoberto que a ApoE apresentava polimorfismo genético e que suas isoformas se ligam ao receptor de LDL de forma distinta (WEISGRABER; INNERARITY; MAHLEY, 1982; ZANNIS et al., 1982). Desde então, muitos estudos foram realizados com o objetivo de elucidar o papel deste polimorfismo em desordens metabólicas, como por exemplo no mal de Alzheimer, o qual tem como fator de risco a presença do alelo $\epsilon 4$ (GUNGOR et al., 2012; HULTMAN; STRICKLAND; NORRIS, 2013; MORMINO et al., 2014). Paralelamente, diversos estudos têm buscado associação dos diferentes genótipo da ApoE com a susceptibilidade a certas infecções, como a hepatite B, malária, leishmaniose, e até mesmo aos danos causados por estas, como no dano hepático severo por hepatite C e até mesmo a tuberculose (FUJIOKA et al., 2013; SOARES et al., 2010; WOZNIK et al., 2002, 2009; YIN et al., 2010b).

Em um estudo preliminar na Índia, Wozniak et al.(2009) mostrou que o alelo $\epsilon 2$ seria um fator de risco para tuberculose pulmonar em mulheres e que o alelo $\epsilon 3$ seria protetor. Em nosso estudo, não encontramos maior frequência do alelo $\epsilon 2$ nos grupos PPD+ e TB, nem maior frequência do alelo $\epsilon 3$ no grupo PPD-. Todavia, essa discordância pode ser explicada pelo pequeno número de indivíduos arrolados para o nosso estudo. Contudo, Laskowitz e colaboradores (2000), constatou que a proliferação de linfócitos estimulados com toxóide tetânico não era influenciada pela isoforma de ApoE. Da mesma maneira, não encontramos alteração da atividade microbicida associada às isoformas da ApoE. Portanto, mais estudos se fazem necessários para melhor avaliar a correlação das isoformas com a atividade microbicida *in vitro* frente ao Mtb.

Apesar do papel da ApoE estar melhor caracterizado no metabolismo lipídico, dados da literatura sugerem que essa molécula tenha relevância na ativação da resposta imune. Estudos utilizando camundongos nocautes para APOE (APOE-/-) mostraram uma deficiência na resposta imune inata e baixa taxa de sobrevivência frente a infecções por *Listeria monocytogenes* (ROSELAAR; DAUGHERTY, 1998) e *Klebsiella pneumoniae* (DE BONT et al., 2000). Em um

outro trabalho, onde animais APOE^{-/-} foram alimentados por uma dieta rica em colesterol, mostrou-se uma grande suscetibilidade e uma taxa de sobrevivência baixíssima, frente à infecção pelo Mtb, provavelmente devido a uma dificuldade no desenvolvimento da imunidade adaptativa (MARTENS et al., 2008). Quanto ao estudo da influência da ApoE em modelos humanos de infecção *in vitro*, Van den Elzen e colaboradores (2005), evidenciaram a sua importância em co-culturas de macrófagos com DCs, demonstrando que a ApoE produzida pelos macrófagos poderia se ligar aos antígenos lipídicos do Mtb e que assim estes podiam ser transferidos para as DCs vizinhas.

Diante deste contexto, nossos dados em infecção *in vitro* de CMSP humano revelaram que a depleção da ApoE, mesmo tendo atingido apenas 30%, levou a um aumento significativo da carga bacilar após 72 horas, sugerindo que a ApoE tem uma influência significativa na atividade microbicida nesse modelo. Estes dados corroboram os dados obtidos no desafio *in vitro* utilizando esplenócitos de camundongos APOE^{-/-} infectados com Mtb. Com base em nossas observações e nos dados de outros autores, acreditamos que a ApoE, independentemente de sua isoforma, possa contribuir para o estabelecimento de uma resposta imune adequada, associada com a defesa do hospedeiro frente à infecção pelo Mtb.

Visando melhor compreender a influência da ApoE na modulação e direcionamento da resposta imune, dosamos as citocinas IFN- γ e IL-10. Os níveis de IFN- γ , citocina essencial para direcionamento para uma resposta do tipo Th1 e consequente controle da tuberculose, apresentou uma tendência à diminuição da produção dessa citocina após depleção da ApoE. Este dado se correlaciona à diminuição na atividade microbicida, já que o IFN- γ tem o papel de ativar macrófagos e potencializar a destruição das micobactérias fagocitadas. A correlação entre a menor produção de IFN- γ e a ausência de ApoE foi relatada por outros autores. Em 2005, Van den Elzen *et al.*, mostraram menores níveis dessa citocina em ensaios com plasma depletado de ApoE e sua produção restaurada quando a lipoproteína era reposta, num modelo de infecção *in vitro* utilizando galactosil(α 1-2) galactosil ceramida (GGC). Martens e colaboradores (2008), revelaram menor produção dessa citocina em esplenócitos de camundongos APOE^{-/-}, após desafio *in vivo* com Mtb. Considerando-se a possível associação do aumento da produção de IFN- γ com a proteção contra

micobactérias (CASTILLO-RODAL et al., 2006) e os dados aqui apresentados, a ApoE pode ser associada ao direcionamento para uma resposta do tipo Th1, protetora frente à infecção pelo Mtb.

Analisando os níveis de IL-10, no grupo PPD-, observamos um aumento desta citocina após 72 horas nas culturas infectadas, independentemente da presença de ApoE, em relação ao grupo controle. Já no grupo PPD+, após 72 horas, houve uma redução significativa na produção de IL-10, nas culturas depletadas de ApoE (xApoE), quando comparadas ao controle infectado não depletado (Rv), sugerindo uma influência da ApoE na produção desta citocina. Marten e colaboradores (2008), não encontraram diferença significativa na produção dessa citocina em camundongos APOE^{-/-}. Todavia, nossos dados são corroborados por Yin *et al*, os quais mostraram uma diminuição na expressão de mRNA de IL-10 camundongos APOE^{-/-} (YIN et al., 2010a). Outros trabalhos mostram a importância da IL-10 na sobrevivência do Mtb no fagossomo, assim como a indução de maior produção desta citocina por cepas hipervirulentas e na proliferação de Tregs (HIRAKI et al., 2012; NEWTON et al., 2006; O'LEARY; O'SULLIVAN; KEANE, 2011).

Recentemente, nosso grupo demonstrou um aumento na frequência de células T reguladoras *in vitro* em indivíduos saudáveis reativos ao teste tuberculínico (PPD+), após estímulo com diferentes cepas de Mtb sensíveis e resistentes a drogas. (CAMPANA, 2010; STRINGARI, 2012; COVRE, 2013). Nossos dados somados as observações de Van den Elzen e colaboradores (2005) sugerem que a ApoE, presente no soro/plasma humano, possa ser um fator importante na apresentação de antígenos lipídicos a células T. Assim, considerando-se que a ApoE possa ter um papel de ativação de Tregs, assim na sua ausência, haveria uma menor ativação dessas células e consequente uma menor produção de IL-10. Porém, para confirmar tal hipótese mais estudos se fazem necessários.

Finalmente, com o objetivo de verificar a dinâmica da concentração da ApoE durante a infecção *in vitro* pelo Mtb, realizou-se a sua dosagem nos sobrenadantes de cultura depletadas ou não de ApoE, através da passagem por coluna de imunoafinidade. Outros autores encontraram níveis séricos mais elevados de ApoE em pacientes pediátricos com infecções bacterianas (FU et al., 2014; WANG et al., 2012). Em contraste com este estudo, encontramos no

grupo PPD+, após 4h de incubação uma menor concentração de ApoE nos grupos infectados em relação ao grupo controle. Após 72h de incubação, observamos uma diminuição significativa destes níveis no grupo não infectado (Ctrl), tendência seguida pelos outros grupos, até mesmo no grupo PPD-. Nossos dados sugerem uma mobilização da ApoE. Essa discordância com os outros estudos pode ter ocorrido pelo fato do nosso modelo ser *in vitro*, não sofrendo assim influência de órgãos como o fígado, que tem papel crucial na produção dessa lipoproteína. Assim, para melhor estudar sua dinâmica plasmática frente à infecção, são necessários estudos que possam levar em conta essa influência.

6. Conclusões

Nossos dados apontam que:

1. Não houve predominância de determinado alelo da ApoE em nenhum dos grupos estudados;
2. A atividade microbicida não foi relacionada às isoformas de ApoE;
3. A infecção *in vitro* de células na ausência da ApoE levou a um aumento na carga bacilar tanto no modelo humano quanto no murino utilizando esplenócitos APOE^{-/-};
4. A depleção de ApoE resultou em uma diminuição na produção de IFN- γ e redução significativa na produção de IL-10 em indivíduos PPD+.

Conclusão final:

A ApoE, independentemente de sua isoforma, pode influenciar no estabelecimento de uma resposta imune adequada, necessária para a eliminação do bacilo e defesa do hospedeiro frente à infecção pelo Mtb. Diante disso, medicamentos ou produtos imunobiológicos que potencializem a ação dessa molécula poderão ser futuros alvos para o tratamento anti-TB e quimioprevenção da TB latente.

7. Referências

AZEVEDO, O. G. R. et al. Apolipoprotein E plays a key role against cryptosporidial infection in transgenic undernourished mice. **PloS one**, v. 9, n. 2, p. e89562, jan. 2014.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria Executiva. **DATASUS**. Disponível em:

<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinannet/tuberculose/bases/tubercbrnet.def> Acesso em 11 Fevereiro 2014.

BARKAN, D. et al. Mycolic acid cyclopropanation is essential for viability, drug resistance, and cell wall integrity of *Mycobacterium tuberculosis*. **Chemistry & biology**, v. 16, n. 5, p. 499–509, 29 maio 2009.

BLOCH, H. Studies on the virulence of tubercle bacilli; the relationship of the physiological state of the organisms to their pathogenicity. **The Journal of experimental medicine**, v. 92, n. 6, p. 507–26, dez. 1950.

BRIGHENTI, S.; ANDERSSON, J. Local immune responses in human tuberculosis: learning from the site of infection. **The Journal of infectious diseases**, v. 205 Suppl , p. S316–24, 15 maio 2012.

BRIGL, M.; BRENNER, M. B. CD1: antigen presentation and T cell function. **Annual review of immunology**, v. 22, p. 817–90, jan. 2004.

CAMPANA, M. C. F. Avaliação do impacto da presença de células T reguladoras na resposta imune contra o *Mycobacterium tuberculosis* em indivíduos PPD+ e PPD-. 2010. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) Universidade Federal do Espírito Santo. 2010..

CAMPOS, H. S. Etiopatogenia da tuberculose e formas clínicas. **Pulmão RJ**, v. 15, n. 1, p. 29–35, 2006.

CASTILLO-RODAL, A. I. et al. *Mycobacterium bovis* BCG substrains confer different levels of protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection in a BALB/c model of progressive pulmonary tuberculosis. **Infection and immunity**, v. 74, n. 3, p. 1718–24, mar. 2006.

COVRE, L.P. Avaliação do papel de receptores tipo toll 2 e 4 na resposta imune de indivíduos sadios, reativos ou não ao teste tuberculínico, frente ao desafio in vitro com *Mycobacterium tuberculosis*. 2013. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) Universidade Federal do Espírito Santo. 2013.

DE BONT, N. et al. Apolipoprotein E-deficient mice have an impaired immune response to *Klebsiella pneumoniae*. **European journal of clinical investigation**, v. 30, n. 9, p. 818–22, set. 2000.

DE LIBERO, G.; MORI, L. How T cells get grip on lipid antigens. **Current opinion in immunology**, v. 20, n. 1, p. 96–104, fev. 2008.

ERNST, J. D. **The immunological life cycle of tuberculosis** *Nature Reviews Immunology*, 2012.

FU, P. et al. Elevated serum ApoE levels are associated with bacterial infections in pediatric patients. **Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi**, v. 47, n. 2, p. 122–9, abr. 2014.

FUJIOKA, H. et al. Apolipoprotein E4 prevents growth of malaria at the intraerythrocyte stage: implications for differences in racial susceptibility to Alzheimer's disease. **Journal of health care for the poor and underserved**, v. 24, n. 4 Suppl, p. 70–8, nov. 2013.

GENGENBACHER, M.; KAUFMANN, S. H. E. *Mycobacterium tuberculosis*: success through dormancy. **FEMS microbiology reviews**, v. 36, n. 3, p. 514–32, maio 2012.

GOROCICA, P. et al. Componentes glicosilados de la envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis. **Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias**, v. 18, n. 2, p. 142–153, 2005.

GUNGOR, Z. et al. Apo E4 and lipoprotein-associated phospholipase A2 synergistically increase cardiovascular risk. **Atherosclerosis**, v. 223, n. 1, p. 230–4, jul. 2012.

HARRIS, J. et al. T helper 2 cytokines inhibit autophagic control of intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. **Immunity**, v. 27, n. 3, p. 505–17, set. 2007.

HAVEL, R. J.; KANE, J. P. Primary dysbetalipoproteinemia: predominance of a specific apoprotein species in triglyceride-rich lipoproteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 70, n. 7, p. 2015–9, jul. 1973.

HIRAKI, S. et al. Neutralization of interleukin-10 or transforming growth factor- β decreases the percentages of CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells in septic mice, thereby leading to an improved survival. **Surgery**, v. 151, n. 2, p. 313–22, fev. 2012.

HIXSON, J. E.; VERNIER, D. T. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. **Journal of lipid research**, v. 31, n. 3, p. 545–8, mar. 1990.

HULTMAN, K.; STRICKLAND, S.; NORRIS, E. H. The APOE ϵ 4/ ϵ 4 genotype potentiates vascular fibrin(ogen) deposition in amyloid-laden vessels in the brains of Alzheimer's disease patients. **Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 33, n. 8, p. 1251–8, ago. 2013.

KANG, D. D. et al. Profiling early lung immune responses in the mouse model of tuberculosis. **PloS one**, v. 6, n. 1, p. e16161, jan. 2011.

KLEINNIJENHUIS, J. et al. Innate immune recognition of *Mycobacterium tuberculosis*. **Clinical & developmental immunology**, v. 2011, p. 405310, jan. 2011.

KOCH, R. The etiology of tuberculosis. **Review of Infectious Diseases**, p. 109–115, 1982.

KORF, J. et al. The *Mycobacterium tuberculosis* cell wall component mycolic acid elicits pathogen-associated host innate immune responses. **European journal of immunology**, v. 35, n. 3, p. 890–900, mar. 2005.

KOYASU, S.; MORO, K. Th2-type innate immune responses mediated by natural helper cells. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1283, p. 43–9, abr. 2013.

LI, Z.; ZHANG, Y.; SUN, B. Current understanding of Th2 cell differentiation and function. **Protein & cell**, v. 2, n. 8, p. 604–11, ago. 2011.

LIN, P. L.; FLYNN, J. L. Understanding latent tuberculosis: a moving target. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 185, n. 1, p. 15–22, 1 jul. 2010.

LU, Y. et al. Expansion of CD4(+) CD25(+) and CD25(-) T-Bet, GATA-3, Foxp3 and ROR γ t cells in allergic inflammation, local lung distribution and chemokine gene expression. **PloS one**, v. 6, n. 5, p. e19889, jan. 2011.

MAHLEY, R. W. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. **Science (New York, N.Y.)**, v. 240, n. 4852, p. 622–30, 29 abr. 1988.

MARTENS, G. W. et al. Hypercholesterolemia impairs immunity to tuberculosis. **Infection and immunity**, v. 76, n. 8, p. 3464–72, ago. 2008.

MÉNDEZ-SAMPERIO, P. Modulation of tuberculosis-related immune responses by helminths. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v. 44, n. 1, p. 141–4, abr. 2014.

MISHRA, A. K. et al. Lipoarabinomannan and related glycoconjugates: structure, biogenesis and role in Mycobacterium tuberculosis physiology and host-pathogen interaction. **FEMS microbiology reviews**, v. 35, n. 6, p. 1126–57, nov. 2011.

MOODY, D. B. et al. CD1b-mediated T cell recognition of a glycolipid antigen generated from mycobacterial lipid and host carbohydrate during infection. **The Journal of experimental medicine**, v. 192, n. 7, p. 965–76, 2 out. 2000.

MORMINO, E. C. et al. Amyloid and APOE ϵ 4 interact to influence short-term decline in preclinical Alzheimer disease. **Neurology**, v. 82, n. 20, p. 1760–7, 20 maio 2014.

MORRISON, J.; PAI, M.; HOPEWELL, P. C. Tuberculosis and latent tuberculosis infection in close contacts of people with pulmonary tuberculosis in low-income and middle-income countries: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet infectious diseases**, v. 8, n. 6, p. 359–68, jun. 2008.

NERLICH, A. G.; LÖSCH, S. Paleopathology of human tuberculosis and the potential role of climate. **Interdisciplinary perspectives on infectious diseases**, v. 2009, p. 437187, jan. 2009.

NEWTON, S. M. et al. A deletion defining a common Asian lineage of Mycobacterium tuberculosis associates with immune subversion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 42, p. 15594–8, 17 out. 2006.

NICKLISCH, N. et al. Rib lesions in skeletons from early neolithic sites in Central Germany: on the trail of tuberculosis at the onset of agriculture. **American journal of physical anthropology**, v. 149, n. 3, p. 391–404, nov. 2012.

O'LEARY, S.; O'SULLIVAN, M. P.; KEANE, J. IL-10 blocks phagosome maturation in mycobacterium tuberculosis-infected human macrophages. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 45, n. 1, p. 172–80, jul. 2011.

OJHA, A. K. et al. Growth of Mycobacterium tuberculosis biofilms containing free mycolic acids and harbouring drug-tolerant bacteria. **Molecular microbiology**, v. 69, n. 1, p. 164–74, jul. 2008.

PAI, M. et al. Serial testing of health care workers for tuberculosis using interferon-gamma assay. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 174, n. 3, p. 349–55, 1 ago. 2006.

PINKERTON, R. F. et al. ApoE polymorphisms and diarrheal outcomes in Brazilian shanty town children. *ApoE polymorphisms and diarrheal outcomes in Brazilian shanty town children*. v. 43, n. March, 2010.

RAFI, W. et al. "Coinfection-helminthes and tuberculosis". **Current opinion in HIV and AIDS**, v. 7, n. 3, p. 239–44, maio 2012.

REECE, S. T.; KAUFMANN, S. H. E. Floating between the poles of pathology and protection: can we pin down the granuloma in tuberculosis? **Current opinion in microbiology**, v. 15, n. 1, p. 63–70, fev. 2012.

RIBEIRO-RODRIGUES, R. et al. A role for CD4+CD25+ T cells in regulation of the immune response during human tuberculosis. **Clinical and experimental immunology**, v. 144, n. 1, p. 25–34, abr. 2006.

ROSELAAR, S. E.; DAUGHERTY, A. Apolipoprotein E-deficient mice have impaired innate immune responses to *Listeria monocytogenes* in vivo. **Journal of lipid research**, v. 39, n. 9, p. 1740–3, set. 1998.

RUSSELL, D. G. et al. Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. **Nature immunology**, v. 10, n. 9, p. 943–8, set. 2009.

SAKAGUCHI, S.; SAKAGUCHI, N. Regulatory T cells in immunologic self-tolerance and autoimmune disease. **International reviews of immunology**, v. 24, n. 3-4, p. 211–26, 2005.

SALGAME, P. Host innate and Th1 responses and the bacterial factors that control *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Current opinion in immunology**, v. 17, n. 4, p. 374–80, ago. 2005.

SHORE, V. G.; SHORE, B. Heterogeneity of human plasma very low density lipoproteins. Separation of species differing in protein components. **Biochemistry**, v. 12, n. 3, p. 502–7, 30 jan. 1973.

SOARES, N. M. et al. Plasma lipoproteins in visceral leishmaniasis and their effect on Leishmania-infected macrophages. **Parasite immunology**, v. 32, n. 4, p. 259–66, abr. 2010.

SRIDHAR, S.; POLLOCK, K.; LALVANI, A. Redefining latent tuberculosis. **Future microbiology**, v. 6, n. 9, p. 1021–35, set. 2011.

STRINGARI, L. L. Influência de células T reguladoras na atividade microbicida de pacientes com tuberculose pulmonar e indivíduos saudáveis com teste tuberculínico positivo e negativo frente ao desafio com cepas de Mycobacterium tuberculosis sensíveis e multidroga-resistentes. 2012. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) Universidade Federal do Espírito Santo. 2012.

SUGITA, M.; CERNADAS, M.; BRENNER, M. B. New insights into pathways for CD1-mediated antigen presentation. **Current opinion in immunology**, v. 16, n. 1, p. 90–5, fev. 2004.

TORRADO, E.; COOPER, A. M. IL-17 and Th17 cells in tuberculosis. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 21, n. 6, p. 455–62, dez. 2010.

URDAHL, K. B.; SHAFIANI, S.; ERNST, J. D. Initiation and regulation of T-cell responses in tuberculosis. **Mucosal immunology**, v. 4, n. 3, p. 288–93, maio 2011.

UROSEVIC, N.; MARTINS, R. N. Infection and Alzheimer ' s Disease : The APOE ε 4 Connection and Lipid Metabolism. v. 13, p. 421–435, 2008.

VAN CREVEL, R.; OTTENHOFF, T. H. M.; VAN DER MEER, J. W. M. Innate immunity to Mycobacterium tuberculosis. **Clinical microbiology reviews**, v. 15, n. 2, p. 294–309, abr. 2002.

VAN DEN ELZEN, P. et al. Apolipoprotein-mediated pathways of lipid antigen presentation. **Nature**, v. 437, p. 906–910, 2005.

VIGNALI, D. A. A.; COLLISON, L. W.; WORKMAN, C. J. How regulatory T cells work. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 523–532, 2009.

WANG, C. et al. The diagnostic value of apolipoprotein E in pediatric patients with invasive bacterial infections. **Clinical biochemistry**, v. 45, n. 3, p. 215–8, fev. 2012.

WEISGRABER, K. H.; INNERARITY, T. L.; MAHLEY, R. W. Abnormal lipoprotein receptor-binding activity of the human E apoprotein due to cysteine-arginine interchange at a single site. **The Journal of biological chemistry**, v. 257, n. 5, p. 2518–21, 10 mar. 1982.

WINKLER, K. et al. Competition of Abeta amyloid peptide and apolipoprotein E for receptor-mediated endocytosis. **Journal of lipid research**, v. 40, n. 3, p. 447–55, mar. 1999.

WOZNIAK, M. A et al. Apolipoprotein E-epsilon 4 protects against severe liver disease caused by hepatitis C virus. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 36, n. 2, p. 456–63, ago. 2002.

WOZNIAK, M. A et al. Apolipoprotein E-epsilon2 confers risk of pulmonary tuberculosis in women from the Indian subcontinent--a preliminary study. **The Journal of infection**, v. 59, n. 3, p. 219–22, set. 2009.

YIN, M. et al. Lack of apoE causes alteration of cytokines expression in young mice liver. **Molecular biology reports**, v. 37, n. 4, p. 2049–54, abr. 2010a.

YIN, Z. et al. Investigation of the relationship between apolipoprotein E gene polymorphisms and hepatitis B virus infection in northern China. **Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC**, v. 48, p. 1803–1807, 2010b.

ZANNIS, V. I. et al. Proposed nomenclature of apoE isoproteins, apoE genotypes, and phenotypes. **Journal of lipid research**, v. 23, n. 6, p. 911–4, ago. 1982.

8. Anexos

8.1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do estudo: Avaliação da Frequência e Concentração Sérica das diferentes Isoformas da Apolipoproteína-E e sua Associação com a Atividade Microbicida em Indivíduos PPD⁺, PPD⁻ e Pacientes com Tuberculose Pulmonar Ativa.

ENTIDADE EXECUTORA: UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO.

Pesquisador Responsável: Profº Drº Rodrigo Ribeiro Rodrigues – (27) 3335-7295.

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa que pretende determinar a relação entre as diferentes isoformas de apoE (2, 3 e 4) e a susceptibilidade de indivíduos à infecção pela bactéria causadora da tuberculose (TB).

Sua participação neste estudo é voluntária. Você poderá deixar o estudo em qualquer momento. A sua decisão em não participar ou de se retirar do estudo depois do mesmo já ter iniciado não ocasionará nenhum problema no tratamento médico de sua doença ou de seus familiares em nosso hospital, hoje ou no futuro. Você deve tirar todas as dúvidas que possam surgir após você ler e ouvir as explicações deste termo de consentimento.

Justificativa do estudo

A tuberculose é uma doença séria que afeta os pulmões e também pode afetar outras partes do seu corpo. Ela é uma doença muito comum no Brasil sendo causada por uma bactéria chamada *Mycobacterium tuberculosis*.

Acredita-se que a susceptibilidade à infecção pelo *M. tuberculosis*, seja resultante da presença de uma resposta imune ineficaz contra a bactéria. Apenas 10% das pessoas infectadas pelo *M. tuberculosis* irão apresentar alguma forma da doença ao longo da vida, enquanto os 90% restantes dos indivíduos desenvolvem uma resposta imune suficiente para eliminar a bactéria ou pelo menos conter a infecção.

Um dos possíveis fatores que podem levar à uma resposta imune menos eficaz observada na tuberculose seria ser portador de uma isoforma dessa apolipoproteína

que tenha menor capacidade de gerar uma resposta imune protetora contra a bactéria causadora da TB.

Se você (seu representante legal) concordar inicialmente em participar do estudo, você deverá:

1. Informar aos médicos sobre problemas de saúde no passado, ou remédios que esteja tomando no momento.
2. Fazer uma consulta geral que irá incluir entre outras coisas exame físico, peso, pressão arterial e frequência cardíaca.
3. Fazer exame de sangue para HIV, mesmo que você já tenha feito em outro lugar.
4. Fazer Raio-X dos pulmões para avaliar a extensão da sua tuberculose. Se você já fez um Raio-X de pulmão há menos de duas semanas não será necessário repetir.
5. Fazer exame do escarro para confirmar se você está mesmo com tuberculose.
6. Fazer exame de sangue (mais ou menos 45ml) para avaliar o seu estado de saúde e se você tem outras doenças.

Se após esses exames não houver nada que impeça você de entrar no estudo e se você (seu representante legal) ainda quiser participar como voluntário da pesquisa você deverá:

1. Colher sangue do braço (mais ou menos 15 ml).

Confidencialidade

Suas informações pessoais, os resultados dos seus exames e o seu número de registro de participação no estudo que será usado em lugar do seu nome são confidenciais. Somente você e as pessoas envolvidas no estudo (médicos, enfermeiras, a Comissão de Ética em Pesquisa do Centro Biomédico da Universidade Federal do Espírito Santo) terão acesso a elas.

Algumas de suas amostras laboratoriais (sangue e escarro) poderão ser usadas em outros estudos de Tuberculose. Neste caso sua privacidade também será mantida, conforme prevê a lei brasileira.

Custos

Você não terá despesas decorrentes de sua participação no estudo. Todos os medicamentos e os exames realizados serão gratuitos.

Consentimento

Confirmo ter conhecimento do conteúdo deste termo. A minha assinatura ou minha impressão digital abaixo indica que concordo em participar desta pesquisa e por isso dou meu consentimento.

Assinatura do participante da pesquisa

Eu expliquei a proposta deste estudo para o voluntário (seu representante legal). Tenho plena convicção que ele/ela entendeu o objetivo, os procedimentos, os riscos e os benefícios da participação no estudo.

Assinatura do Investigador

Assinatura da Testemunha

Em caso de desconfortos ocasionados pelos procedimentos citados, dúvidas em relação a este documento ou durante o desenvolvimento do projeto, você poderá entrar em contato com o Comitê Ética em Pesquisa – CEP da Universidade Federal do Espírito Santo, pelo telefone 3335 -7211 ou e-mail: cep.ufes@hotmail.com.